

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Anna Hustedová

Metody diagnostiky klíšťové encefalitidy: současnost a trendy

Diagnostics of Tick-borne Encephalitis: Present State and Future

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 5. 2017

.....

Anna Hustedová

Děkuji své školitelce, paní doktorce Hance Španielové za velkou trpělivost a cenné rady při psaní této práce. Děkuji také svým blízkým, kteří mě podporovali.

Abstrakt

Klíšťová encefalitida je nejzávažnější klíštětem přenášená neuroinfekce v Evropě a v Asii. Tato práce se zabývá jejím původcem, virem klíšťové encefalitidy (TBEV). Pro diagnostiku infekce lze využít detekci anti-TBEV protilátek v séru pacienta pomocí metody ELISA. Protilátky vznikající v průběhu infekce však často zkříženě reagují s protilátkami proti jiným flavivirům. Jako antigen využívají ELISA testy nejčastěji inaktivovaný virus, jehož výroba je omezena na laboratoře s BSL 3. Tato práce se proto zaměřila na hledání možností přípravy specifických antigenů pro sérologickou diagnostiku TBEV infekce pomocí heterologních expresních systémů. Jako nové antigeny byly využity části glykoproteinu E a subvirové částice. Výroba antigenu ve formě subvirových částic se zdá být jako vhodná alternativa k inaktivovanému viru.

Klíčová slova: Virus klíšťové encefalitidy, klíšťová encefalitida, ELISA, antigen, subvirové částice, glykoprotein E

Abstract

Tick-borne encephalitis is one of the most severe tick-borne neuroinfections in Europe and Asia. This thesis is focused on its source, Tick-borne encephalitis virus (TBEV). Diagnostics of TBEV is usually based on detection of specific anti-TBEV antibodies in patient's serum by using enzyme-linked immunosorbent assay. However antibodies that develop during the infection often cross-react with other flavivirus specific antibodies. As an antigen for ELISA tests the formalin inactivated virus is usually used, its production is restricted to laboratories with biosafety level 3. This thesis is seeking for possibilities of production of specific antigen for serological diagnostic of TBEV using heterologous expression systems. As the new antigens, parts of glycoprotein E and subviral particles were used. Production of antigen in the form of subviral particles seems to be a good alternative to inactivated virus.

Key words: Tick-borne encephalitis virus, Tick-borne encephalitis, ELISA, antigen, subviral particles, glycoprotein E

Seznam použitých zkratk

BSL.....	biosafety level, úroveň technického zabezpečení
C, prM (M), E.....	kapsidový protein, prekurzor (membránového) proteinu, envelope protein
cDNA.....	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CF.....	komplement fixační test
CSF.....	cerebrospinální tekutina
EdIII.....	doména III glykoproteinu E, neboli envelope proteinu
IC ELISA.....	Immunokomplex enzyme-linked immunosorbent assay
Etr.....	C-terminálně zkrácený E protein (bez transmembránové části)
EU, aEU.....	evropský subtyp TBEV, antigen vyrobený z evropského subtypu
FE.....	dálnovýchodní subtyp TBEV
HI.....	hemaglutinačně-inhibiční test
IB, WB.....	imunoblot, western blot
IF.....	imunofluorescence
NS.....	nestrukturní protein
NT.....	neutralizační test
ORF.....	open reading frame
RNA.....	ribonukleová kyselina
RT-LAMP.....	reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification
SI, aSI.....	sibiřský subtyp TBEV, antigen vytvořený ze sibiřského subtypu
SPs.....	subvirové partikule
TBE.....	klíšťová encefalitida
TBEV.....	virus klíšťové encefalitidy
UTR, NCR.....	untranslated region, noncoding region

Obsah

Úvod.....	1
1. Klíšťová encefalitida	2
2. Způsoby přenosu viru klíšťové encefalitidy na člověka	5
3. Přenašeči viru klíšťové encefalitidy	5
4. Rozšíření viru klíšťové encefalitidy	6
5. Genom viru klíšťové encefalitidy.....	8
5.1 Strukturní proteiny	9
5.1.1 Kapsidový protein	9
5.1.2 Membránový protein	9
5.1.3 Glykoprotein E	9
5.2 Nestrukturní proteiny	10
6. Životní cyklus viru klíšťové encefalitidy	11
7. Subtypy viru klíšťové encefalitidy	12
8. Detekce viru klíšťové encefalitidy	14
8.1 Zdroje vzorku	14
8.2 Metody přímé detekce viru klíšťové encefalitidy	15
8.2.1 PCR (Polymerase-chain reaction)	15
8.2.2 Izolace virových partikulí.....	16
8.3 Metody nepřímé detekce viru klíšťové encefalitidy.....	17
8.3.1 Neutralizační test.....	18
8.3.2 Komplement fixační test	19
8.3.3 Hemaglutinačně inhibiční test	19
8.3.4 ELISA.....	19
8.3.5 Imunofluorescence	20
8.3.6 Imunoblot	20
8.3.7 Test avidity IgG protilátek	21
8.4 Diagnostické metody využívané v Evropě.....	23

9. Výběr a příprava antigenu na ELISA.....	24
9.1 Antigenní epitopy.....	24
9.2 Glykoprotein E jako antigen pro ELISA.....	26
9.3 Subvirové partikule jako antigen pro ELISA.....	27
9.4 Porovnání ELISA využívající SPs antigen a ELISA využívající EdIII antigen	30
9.5 Další vývoj	31
9.6 Dosud nevyužité možnosti budoucí diagnostiky viru klíšťové encefalitidy.....	33
Závěr	34
Zdroje	35
Internetové zdroje	40

Úvod

Virus klíšťové encefalitidy (dále TBEV z anglického Tick-Borne Encephalitis Virus), patřící do čeledi Flaviviridae (rod Flavivirus), je původcem závažné endemické neuroinfekce, klíšťové encefalitidy. Klíšťová encefalitida je v současnosti jedno z nejvýznamnějších klíštětem přenášených onemocnění, endemických v oblasti Evropy a Asie.

Genomem TBEV je jednořetězcová ribonukleová kyselina s pozitivní polaritou. TBEV je obalený virus a bývá rozdělován na tři subtypy: evropský (EU), sibiřský (SI) a dálnovýchodní (FE). Virus je na lidi přenášen klíšťaty *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus*.

Cílem této práce je stručně představit epidemiologii, rozšíření, genom a subtypy TBEV, popsat fáze klíšťové encefalitidy (časnou a neurologickou). Zvláště se práce ovšem bude zabývat tématem diagnostiky klíšťové encefalitidy, metodami, které jsou v současnosti využívány k detekci klíšťové encefalitidy na území České republiky a v jiných zemích. Porovnány budou metody přímé, využitelné v časně (viremické) fázi onemocnění, s metodami nepřímými, které lze aplikovat v pozdější neurologické fázi infekce.

V momentě, kdy většina pacientů navštěvuje svého doktora, obvykle již pominula viremická fáze infekce. Jelikož se virus poté replikuje v nervové tkáni, není již možné v séru přítomnost viru detekovat. Z toho důvodu jsou obvykle využívány zvláště nepřímé metody v séru zachycující specifické protilátky pacienta proti TBEV. Jejich nevýhodou je však vysoké procento zkřížené reaktivity specifických IgM a IgG protilátek v případě, že byl pacient infikován jiným typem flaviviru, či proti němu byl očkovan. Z toho důvodu se jako upřesňující metody využívá neutralizačního testu, jehož provedení je však omezeno na laboratoře s úrovní 3 technického zabezpečení (BSL 3, z ang. biosafety level).

V závěrečné fázi se práce věnuje přípravě a výběru antigenu pro nepřímou ELISA, nejčastěji využívanou metodu detekce TBEV. Zabývá se novými přístupy, které by mohly vést k odstranění dosavadních diagnostických problémů.

1. Klíšťová encefalitida

Klíšťová encefalitida (TBE, z angl. Tick-Borne Encephalitis) je zánětlivé onemocnění mozku vyvolané virem klíšťové encefalitidy. Jedná se o tzv. arbovirovou (z anglického arthropod-borne) infekci, neboť patogen je na člověka přenášen hematofágním hmyzem. Klíšťová encefalitida je zoonóza, přirozeně koluje mezi zvířaty (zvláště mezi hlodavci), člověk je tedy pouze náhodným hostitelem, a tak se nemoc dále nešíří (Růžek et al., 2011). Klíšťová encefalitida může být způsobena více původci, kteří však nejsou z epidemiického hlediska významní (viz tabulka 1).

Savčí klíštětem-přenášené flaviviry				
Název viru	Klinický projev	Postihuje člověka?	Výskyt	Počet případů/rok
Virus klíšťové encefalitidy	encefalitida	ano, také	Stř. Evropa-Asie	10000-15000
Virus louping ill	encefalitida	ne	Velká Británie	0
Virus omské hemoragické horečky	hemoragická horečka	ano, také	Západní Sibiř	~30
Virus langat	encefalitida	spíše ne	Malajsie	0
Virus nemoci kyanasurského lesa	hemoragická horečka	ano, také	Indie	400-500
Virus powassan	encefalitida	ano, také	SV Amerika	~7

Tabulka 1 Tabulka zobrazuje seznam zástupců skupiny savčích klíštětem-přenášených flavivirů včetně základních informací. * Počet nahlášených lidských případů/rok. Zpracováno dle: ("CDC Powassan," 2017) ("CDC Kyasanur," 2014), (Bogovic, 2015), ("CDC OHF," 2013), (Růžek et al., 2010), (Jeffries et al., 2014), (Muhd Radzi et al., 2015).

Dle sérologických průzkumů vyplývá, že průběh nemoci bývá ve více než dvou třetinách infikovaných případů asymptomatický (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012, s.2). Závažnost klinických projevů klíšťové encefalitidy se však různí zvláště dle subtypu TBEV (viz tabulka 2), jímž je jedinec infikován a dle stavu imunitního systému pacienta (Chmelík et al., 2016). Infekce dálnovýchodním subtypem TBEV byla například dříve nazývána Russian spring-summer encephalitis. Klíšťová encefalitida může mít asymptomatický, bifázický, či monofázický průběh (obvykle pouze neurologická fáze u východních subtypů – sibiřského, dálnovýchodního), abortivní formu, či chronickou progresivní formu (Bogovic et al., 2010; Dumpis et al., 1999; Gritsun et al., 2003).

Subtyp	Mortalita (%)	Bifázický průběh (%)	Chronický průběh
Evropský	0,5-2	74	ne
Sibiřský	2-6	21	ano
Dálnovýchodní	15-30	3-8	ano

Tabulka 2 Tabulka shrnuje informace o infekci jednotlivými subtypy TBEV. Zpracováno dle (Bogovic et al., 2010; Dumpis et al., 1999; Lotric-Furlan et al., 2002).

Po kousnutí infikovaného klíštěte se virus množí v podkožních tkáních, dostává se do spádových lymfatických uzlin a putuje do krve. V tuto chvíli nastává období primární virémie. Dále virus obvykle napadá nervovou tkáň, kde se opět množí.

V České republice se vyskytuje pouze evropský subtyp TBEV, proto mívá klíšťová encefalitida obvykle bifázický průběh.

Po 7-14 dní dlouhé inkubační době nastává první fáze infekce, která trvá 2-7 dní. Stav pacienta v této fázi se vyznačuje nespecifickými symptomy podobnými chřipce. Jedná se o období primární virémie, kdy je možné virus detekovat v krvi. U pacienta lze zaznamenat leukocytopenii a trombocytopenii. Objevují se horečnaté stavy, gastroenteritida, bolesti hlavy a kloubů, únava a slabost (Chmelík et al., 2016). Malé množství pacientů se po prodělání první fáze infekce uzdraví (tzv. abortivní forma TBE) (Lotric-Furlan et al., 2002).

Ve většině případů ovšem nastane asymptomatická fáze trvající 4-10 dní a následně druhá fáze infekce, kdy dochází k napadení nervové tkáně pacienta. V tomto okamžiku dochází k vývoji specifických protilátek u pacienta. Druhá fáze klíšťové encefalitidy může být dle zasažených oblastí nervové soustavy různě závažná (viz tabulka 3).

Klinické projevy druhé fáze klíšťové encefalitidy	Průměrně procent (%)
Serózní meningitida (zánět mozkových blan)	49
Meningoencefalitida (zánět mozkových blan a mozku)	41
Encefalomyelitida (zánět mozku a míchy)	10

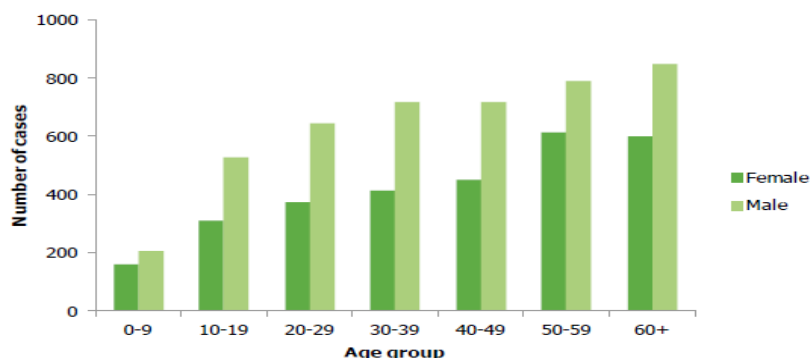
Tabulka 3 Procentuální zastoupení klinických projevů v průběhu druhé fáze klíšťové encefalitidy. Procentuální výskyt jednotlivých projevů TBE odpovídá infekci evropským subtypem TBEV. Zpracováno dle (Lotric-Furlan et al., 2002).

U závažnějších forem se mohou projevit dlouhodobé následky, např. tzv. post-encefalický syndrom (kognitivní, či neuropsychiatrické potíže), který nastává až v 50 % případů s encefalickou formou, či jednostranná obrna lícního nervu, která se obvykle po jistém čase zrehabilituje. Následky mohou být ovšem i trvalé. Jednostranná obrna svalů pletence pažního již vratná není. V nejtěžších případech se vzácně projeví bulbární forma klíšťové encefalitidy, která může mít za následek nevratnou kvadruparézu. Tato forma bez hospitalizace obvykle končí smrtí (Havlík, 2010).

Chronická progresivní forma bývá spojována zvláště se sibiřským subtypem TBEV, byly však zaznamenány i případy chronické TBE při infekci FE subtypem. V souvislosti s infekcí evropským subtypem TBEV však potvrzena nebyla. Jedná se o dlouhodobé, neustávající, obvykle zhoršující se stavy. Zaznamenanými patologickými projevy jsou Koževnikova epilepsie, progresivní neuritida, amyotrofická laterální skleróza, progresivní svalová atrofie a projevy podobné Parkinsonově chorobě (Bogovic et al., 2010; Mukhin et al., 2012). Chronická progresivní forma klíšťové encefalitidy může mít za následek smrt i po více letech od počátku infekce, a to obzvláště u jedinců, u nichž se nevyvinuly protilátky proti TBEV (Gritsun et al., 2003).

S vyšším věkem pacienta přibývá vážnějších projevů TBE (Kaiser, 1999). Zvláště rizikovou skupinou jsou muži ve věku 40-65 let, nejčastěji pracující v oblastech s hojnou vegetací (viz obrázek 1).

Figure 9. Number of TBE cases by gender and age, Czech Republic (n=7 371, data from 2000–2010 pooled)



Obrázek 1 Tento graf vyobrazuje množství případů klíšťové encefalitidy, rozdělené do sloupců dle pohlaví a věku. Osa x vyjadřuje věk pacientů s TBE a osa y počet případů TBE. Světle zelené sloupce zastupují muže a tmavě zelené sloupce ženy. Data jsou sumarizována z let 2000–2010. Převzato z (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012, s.19)

Léčba klíšťové encefalitidy není doposud dostupná, ovšem probíhají studie, které se touto tematikou intenzivně zabývají. Slibné by mohly být C2' methylované, či C4' azido-substituované analogy nukleosidů, které prokazují vysokou protivirovou aktivitu a zároveň nízkou cytotoxicitu (Eyer et al., 2016).

Klíšťové encefalitidě způsobené TBEV lze však účinně předcházet pomocí vakcinace formalinem inaktivovaným virem (viz tabulka 4). Vakcíny chrání proti všem třem subtypům TBEV (Orlinger et al., 2011). Úspěšnost sérokonverze po třech dávkách vakcíny je nad 95 % (vzácně se tedy objevují i případy TBE u pacientů, u nichž vakcinace selhala) (Bender et al., 2004; Leonova et al., 2007).

Infekci TBEV je samozřejmě také záhodno předcházet využitím repelentu, vhodného oblečení a obuvi.

Přehled vakcín proti TBE licencovaných v Kanadě, Evropě a v Rusku				
Obchodní název (výrobce, původ)	Věk	Dávka	První booster (roky)	Subtyp*
FSME-IMMUN (Baxter, Rakousko)	16+	0,5 ml	3	evropský
FSME-IMMUN Junior (Baxter, Rakousko)	1-15	0,25 ml	3	evropský
Encepur-Adults (Novartis, Německo)	17+	0,5 ml	3	evropský
Encepur - Children (Novartis, Německo)	1-11	0,25 ml	3	evropský
EnceVir (Microgen, Rusko)	3+	0,5 ml	1	dálnovýchodní
TBE-Moscow (Chumakov Institute, Rusko)	3+	0,5 ml	1	dálnovýchodní

Tabulka 4 Tabulka shrnuje základní informace o v současné době licencovaných vakcínách proti TBE. Ve všech případech se jedná o vakcíny injikované intramuskulárně. *Subtyp TBEV, z něhož je vytvořena vakcína. Ve všech případech se také jedná o formalinem inaktivovaný virus. Zpracováno dle (Lehrer and Holbrook, 2011).

2. Způsoby přenosu viru klíšťové encefalitidy na člověka

TBEV je přenášen zástupci čeledi Ixodidae (*Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*). Člověk se nejčastěji nakazí kousnutím infikovaného klíštěte. Existují však i další cesty přenosu TBEV na člověka.

Stále se vyskytují případy infekce TBEV konzumací nepasterizovaného mléka, či jeho produktů (zvláště mléko kozí, ovčí, občas i kravské). TBEV se během virémie ve zvířeti dostává nejen do krve, ale také do mléka, a tak je možné nakazit se alimentární cestou. Virus zůstává infekční v rozsahu pH 2,75-11,55 a až po dobu třiceti minut v teplotě 65°C. Z toho důvodu se může dostat též do mléčných produktů, které nejsou vystaveny pH mimo výše uvedený rozsah, či dostatečně dlouho vysokým teplotám (jak tomu bývá u sýrů z nepasterizovaného mléka). První případ nákazy virem TBEV alimentární cestou byl v tehdejší Československu zaznamenán roku 1974 (Gresíková et al., 1975).

Případy infekce alimentární cestou nejsou příliš časté, ovšem stále se vyskytují. Například roku 2007 se v Maďarsku ze 154 exponovaných jedinců 25 nakazilo TBEV konzumací kozího mléka na farmě (Balogh et al., 2010). Brzy poté, roku 2008, se v rakouském Vorarlbergu ze sedmi exponovaných jedinců čtyři nakazili konzumací kozího sýra (Holzmann et al., 2009).

Poslední možnou cestou přenosu TBEV na člověka je infekce virem obsaženým v aerosolu. Tato situace nastává nejčastěji v laboratořích. Proto, je vhodné, aby jedinci, kteří s virem v laboratorních podmínkách pracují, byli proti TBEV vakcinováni (Avsic-Zupanc et al., 1995).

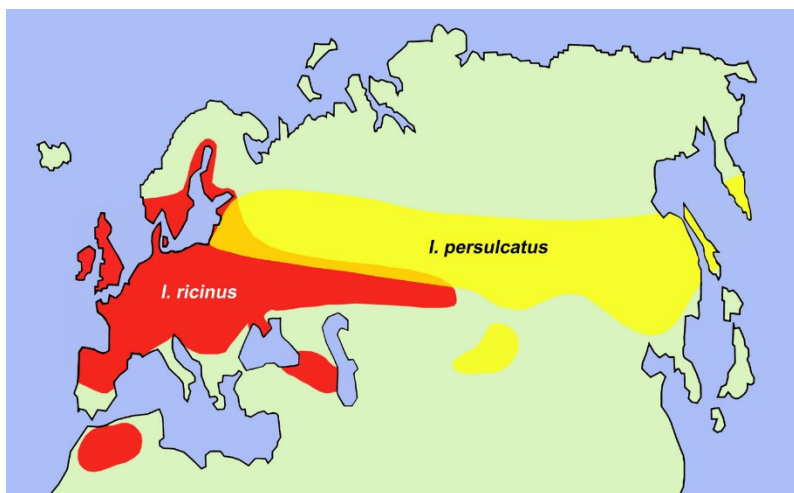
3. Přenašeči viru klíšťové encefalitidy

Hlavními přenašeči TBEV na člověka jsou klíšťata *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus*, členovci patřící do podtřídy Acari (roztoči), čeledi Ixodidae (rozšíření viz obrázek 2). V České republice je přenašečem TBEV *Ixodes ricinus*.

Ixodidae (ang. hard ticks) jsou gonochoristé, ektoparaziti, prochází čtyřmi vývojovými stádii: vajíčko, šestinohá larva, osminohá nymfa a dospělec. Larvální a nymfální stádia obou pohlaví sají krev, a jsou tedy schopna přenosu TBEV. U dospělců saje pouze samice, která je zřetelně větší (asi 2*4 mm) než samec. Ixodidae mají tzv. tříhostitelský cyklus, každé stádium saje na jiném hostiteli, a to pouze jednou. Na člověku sají obvykle zvláště nymfy a dospělé samice. Samec vyhledává hostitele, aby našel samičku a mohlo dojít k páření. Samička vyprodukuje 2500-4000 vajíček a poté uhyne. Celý vývoj klíštěte trvá obvykle 3 roky.

Klíště narušuje kůži pomocí hypostomu, při sání vypouští sliny obsahující různé imunosupresivní látky a látky bránící hemostázi (Kopecký and Kuthejlová, 1998). Sliny obsahují zároveň i patogeny (např. TBEV). Klíšťata se mohou TBEV nakazit při sání z nakaženého hostitele, co-feedingem, tedy pokud nakažené a

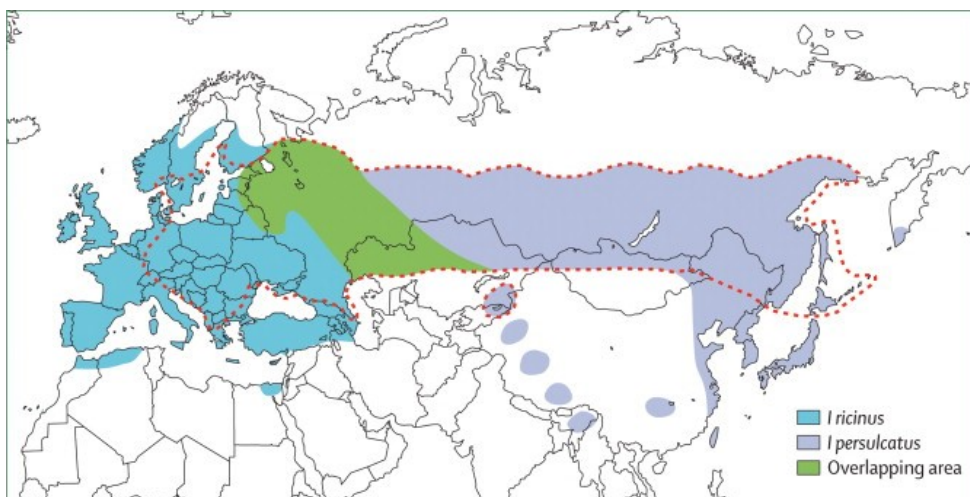
nenakažené klíště saje na tomtéž hostiteli blízko sebe, či transovariálně, vertikálním přenosem viru ze samičky na vajíčka (Nosek and Grulich, 1967).



Obrázek 2 Rozšíření *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus*.. Převzato ze (Süs, 2011).

4. Rozšíření viru klíšťové encefalitidy

TBEV je endemický v Evropě a v Asii, koreluje s výskytem přenašečů, *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus* (viz obrázek 3). V oblasti střední, východní a severní Evropy se vyskytuje převážně evropský subtyp TBEV (občas nazývaný západní subtyp, ang. European, či Western subtype), přenášený zvláště klíšťaty *Ixodes ricinus*.



Obrázek 3 Rozšíření TBEV (červeně ohraničená oblast) koreluje s rozšířením jeho přenašečů, *Ixodes ricinus* (modřře) a *Ixodes persulcatus* (fialově). Oblast, kde se vyskytují oba druhy je vyznačena zeleně. Převzato ze (Lindquist and Vapalahti, 2008).

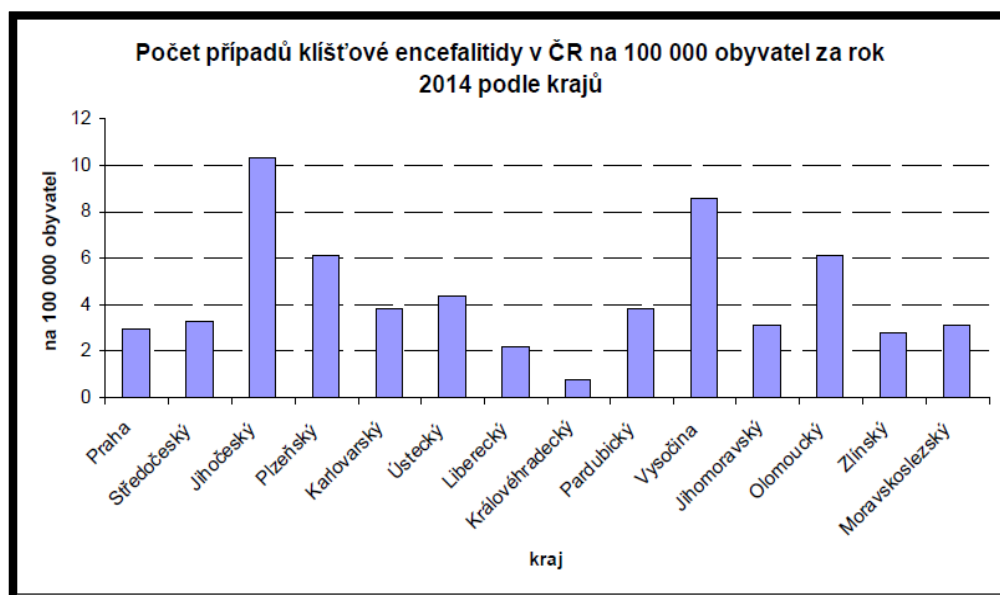
Sibiřský subtyp se vyskytuje ve východní Evropě, v Rusku a v severní Asii. Ve východním Rusku a v některých oblastech Číny a Japonska se vyskytuje dálnovýchodní subtyp.

Sibiřský a dálnovýchodní subtyp bývají občas, vzhledem vzájemné bližší příbuznosti, sloučeny ve skupinu východní subtypy (ang. Eastern subtypes), obvykle je přenáší klíšťata *Ixodes persulcatus*.

Existují ale samozřejmě případy, kdy byl například evropský subtyp izolován z klíštěte *Ixodes persulcatus* (Jääskeläinen et al., 2011).

Na základě fylogenetických studií bylo potvrzeno, že se TBEV v minulosti šířil z východu, z Asie, na západ, do Evropy. Totéž platí o šíření viru v rámci střední Evropy (Weidmann et al., 2011). V současnosti se rozšíření TBEV posouvá dále na západ. V roce 2016 byl zaznamenán první autochtonní případ TBE na území Nizozemského království (v oblasti Hueverlug) (de Graaf et al., 2016).

V České Republice je nejvyšší incidence hlášena v rámci Jihočeského kraje a dále v rámci kraje Vysočina. Ročně je v České republice hlášeno obvykle 400-1000 případů. Nejvyšší četnost byla zaznamenána roku 2006, kdy bylo nahlášeno 1029 případů TBE (viz obrázek 4) (Gašpárek et al., 2015). Nezřídka bývají zaznamenány importované případy klíšťové encefalitidy (Chaudhuri and Růžek, 2013).



Obrázek 4 Na grafu je vyobrazen počet případů klíšťové encefalitidy v České republice na 100 000 obyvatel za rok 2014. Případy jsou členěny dle četnosti v jednotlivých krajích ČR. Převzato z (Gašpárek et al., 2015).

Výskyt infikovaných klíšťat se ovšem posouvá též v rámci nadmořské výšky. Klíšťata *Ixodes ricinus* v oblasti Krkonoš dříve nebyla schopna dokončit cyklus v nadmořských výškách nad 750 m n. m., dnes jsou však schopna přežít ve výškách až 1140 m n. m. Tato skutečnost byla zkoumána v oblastech, kde se neměnily socio-ekonomické faktory, jediným měnícím se faktorem byla zvyšující se průměrná roční teplota, a proto se právě ta ukázala být důvodem rozšíření oblastí výskytu *Ixodes ricinus*. (Danielová et al., 2010).

Domnívám se, že vliv na počet diagnostikovaných případů mohou mít též zlepšující se metody diagnostiky klíšťové encefalitidy a rozšíření oblastí, kde je klíšťová encefalitida detekována. Vliv na počet nahlášených případů TBE má pravděpodobně i povinné hlášení případů s TBE v rámci šestnácti zemí Evropské Unie a

zemí EFTA (Norsko, Švédsko, Finsko, Litva, Estonsko, Lotyšsko, Polsko, Německo, Česká Republika, Švýcarsko, Rakousko, Slovensko, Slovinsko, Maďarsko, Rumunsko a Řecko) (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012).

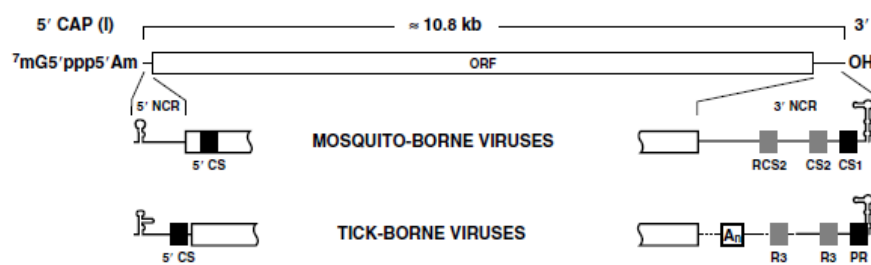
5. Genom viru klíšťové encefalitidy

Genom TBEV se skládá z nesegmentované jednořetězcové ribonukleotidové kyseliny s pozitivní polaritou, dlouhé asi 11 000 nukleotidů (viz obrázek 5). Virová RNA je tedy stejné polarity jako buněčná mRNA. Samotná virová RNA je infekční (Peleg, 1969).

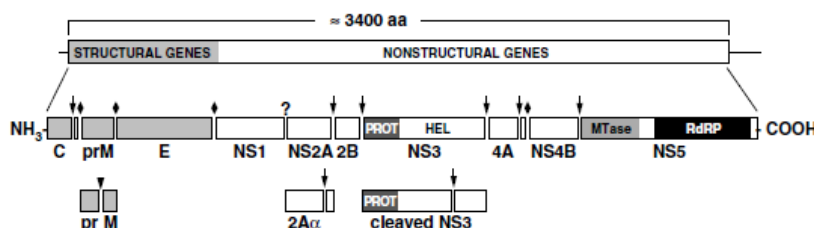
Zralé viriony TBEV jsou v průměru velké asi 50 nm. Jsou složeny z kapsidy, obsahující virovou RNA, která je obalena lipidovou dvojvrstvou obsahující dva glykoproteiny: protein M a glykoprotein E. Stejně jako mRNA má virová RNA na 5' konci 7-methylguanosinovou čepičku (m7G). Na 3' konci však oproti mRNA nemá polyA oblast (některé kmeny však mohou obsahovat interní polyA oblast v rámci 3' UTR) (Wallner et al., 1995).

Virová RNA obsahuje jeden čtecí rámec (ORF z ang. open reading frame), kódující polyprotein (v němž je uspořádání proteinů v rámci rodu Flavivirus téměř neměnné), který sestává z 3414 aminokyselin. Polyprotein je ohraničen dvěma nepřekládanými oblastmi (UTR, či NCR, z ang. untranslated region), konzervovanou 5' UTR oblastí a variabilní 3' UTR oblastí. 5' UTR oblast je složena z 131 nukleotidů, tvoří několik smyček a obsahuje AUG translační start kodon. 3' UTR je tvořena 31-728 nukleotidy, vytváří smyčku, která hraje roli při replikaci virové RNA. Délka 3' UTR oblasti je variabilní u jednotlivých kmenů TBEV, typické jsou různě dlouhé delece. Velmi dlouhé delece v 3' UTR pravděpodobně souvisí s nižší patogenitou kmenu (Belikov et al., 2014).

A. Flavivirus genome: RNA elements



B. Flavivirus genome: protein expression



Obrázek 5 Obrázek ilustruje stavbu genomu flavivirů. (A) Vybrazeny jsou RNA elementy na 5' konci a podobnosti mezi klíštětem a komáry přenášenými flaviviry. R3 konzervovaný element se nachází v konzervované části 3' UTR, je často duplikován a mohou se zde vyskytovat interní polyA oblasti. (B) Zde je vyobrazena exprese proteinů a štěpení polyproteinu flavivirů. Virová serinová proteáza je naznačena šipkou směřující dolů. Kosočtverce a trojúhelník značí štěpení buněčnou proteázou, obvykle furinem. Protein NS1-2A je štěpen neznámou buněčnou proteázou, která je naznačena otazníkem. Také jsou vyznačeny serin-proteázová a helikázová oblast NS3 a methyltransferázová a RdRP

5' koncová část ORF kóduje strukturní proteiny: kapsidový protein (ang. capsid protein, C; 14kDa), prekursor membránového proteinu (ang. precursor of membrane protein, pr-M; 26kDa), glykoprotein E (z ang. envelope protein, E; 53-60 kDa). Za touto částí souvisle následuje oblast kódující 7 nestrukturních proteinů: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Rice et al., 1985) (viz obrázek 5). Proteiny jsou ko-translačně i post-translačně štěpeny kombinací virových a buněčných proteáz (Potapova et al., 2012; Stadler et al., 1997).

5.1 Strukturní proteiny

5.1.1 Kapsidový protein

Komplex strukturního proteinu C tvoří kapsidu TBEV. Základní stavební jednotkou kapsidy, která je sférického tvaru, je pravděpodobně dimer proteinu C. Obsahuje velké množství (25,5%) aminokyselin lysinu a argininu, které interagují v průběhu skládání s virovou RNA (Kiermayr et al., 2004; Pletnev et al., 1986).

5.1.2 Membránový protein

Protein pr-M (26 kDa) je prekurzorem membránového proteinu M (8 kDa). Proteiny prM a E tvoří heterodimery v nezralých virionech, které se skládají v endoplasmatickém retikulu (viz obrázek 6). Pr-M pravděpodobně brání změně konformace proteinu E, která by v kyselém prostředí při postupu sekreční dráhou skrze buněčné kompartmenty mohla vést k fúzi nezralých virionů. Pr-M je štěpen na fragment pr a protein M buněčnou proteázou (většinou furin) krátce před opuštěním buňky (Stadler et al., 1997). Aktivuje se tak schopnost virionu fúzovat s membránou endocytického váčku (Schalich et al., 1996). Při experimentu, kdy bylo zabráněno štěpení proteinu pr-M, byly produkovány pouze neinfekční partikule. Štěpení proteinu pr-M je tedy nutné k tvorbě zralých infekčních virionů, schopných fúze s membránou endocytického váčku (Elshuber, 2003; Guirakhoo et al., 1991).

5.1.3 Glykoprotein E

Glykoprotein E je též součástí virového obalu. Ve zralých virionech se utváří homodimery (s tzv. head-to-tail orientací) proteinu E, které leží paralelně s lipidovým obalem (viz obrázek 6). Protein zprostředkovává interakci s hostitelskou buňkou a také následnou fúzi s membránou časného endozomu. Fúze je zajištěna změnou konformace proteinů E z dimerní na trimerní formu, která je indukována kyselým pH (pod 6,5) v časném endosomu (Stiasny et al., 2006). Výsledkem je následné uvolnění nukleokapsidy virionu do

cytoplazmy hostitelské buňky (Schalich et al., 1996). Díky tomu, že je glykoprotein E exponován na povrchu virionů, jedná se o hlavní antigen, který indukuje tvorbu neutralizačních protilátek pacienta. Glykoprotein E se skládá ze tří domén (EdI, EdII, EdIII) a z hydrofobní části, kterou je ukotven v membráně (Rey et al., 1995).

5.2 Nestrukturní proteiny

Protein NS1 vyvolává silnou imunitní reakci, ačkoliv není součástí virové partikule TBEV (NS1 je hydrofilní protein, proto tzv. 'rozpuštěný antigen') (Lee et al., 1989). Protein NS1 je glykosylován v Golgiho aparátu a sekretován v podobě oligomeru, jeho struktura je mezi subtypy TBEV velice konzervovaná. Způsobuje úspěšnou imunizaci u sajících laboratorních myší, a tak by mohl být vhodnou alternativou na výrobu vakcín (Jacobs et al., 1993; Schlesinger et al., 1987). Komplex proteinů NS2B-NS3 (N-terminální část) funguje jako virová serinová proteáza. C-terminální část NS 3 obsahuje doménu s helikázovou aktivitou a doménu s RNA trifosfatázovou aktivitou (Bollati et al., 2010). Nestrukturní proteiny 2A, 4A a 4B mají pravděpodobně funkci při replikaci virové RNA. Protein NS5 má dvě domény, první má aktivitu methyltransferázy a druhá RNA dependentní RNA polymerázy (Růžek et al., 2011; Taylor et al., 2011).

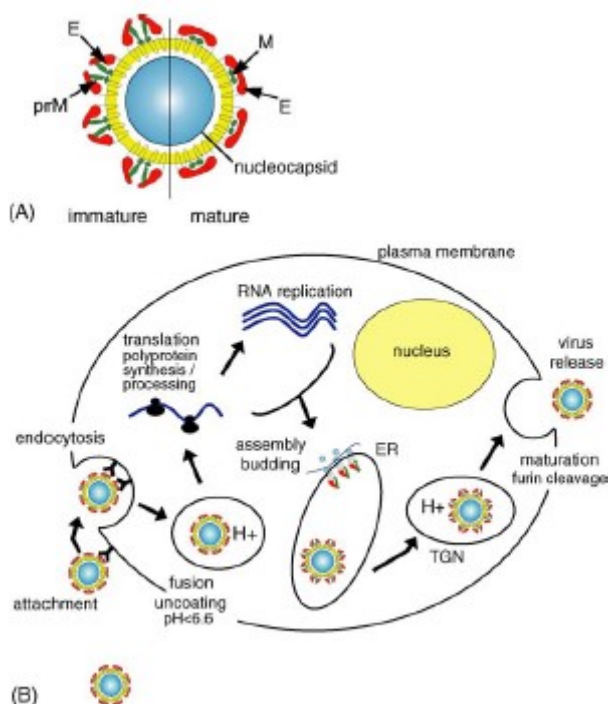
6. Životní cyklus viru klíšťové encefalitidy

Povrchový glykoprotein E interaguje s hostitelskými buněčnými receptory. Receptorem zprostředkovaná endocytóza probíhá skrze klathrinové váčky. Okyselující se prostředí endozomu indukuje změnu konformace dimerů E proteinu na trimery a tím spustí fúzi virového obalu s membránou endozomu (Schalich et al., 1996). Nukleokapsida se uvolní do cytoplazmy (Mandl, 2005).

Virová RNA vzhledem k pozitivní polaritě řetězce, shodně s polaritou mRNA, postupuje přímo k translaci. Translaci vzniká polyprotein, který je štěpen na jednotlivé výše zmíněné proteiny (viz obrázek 5B).

RNA s pozitivní polaritou je přepsána do RNA s negativní polaritou, která následně slouží jako templát pro replikaci virové RNA.

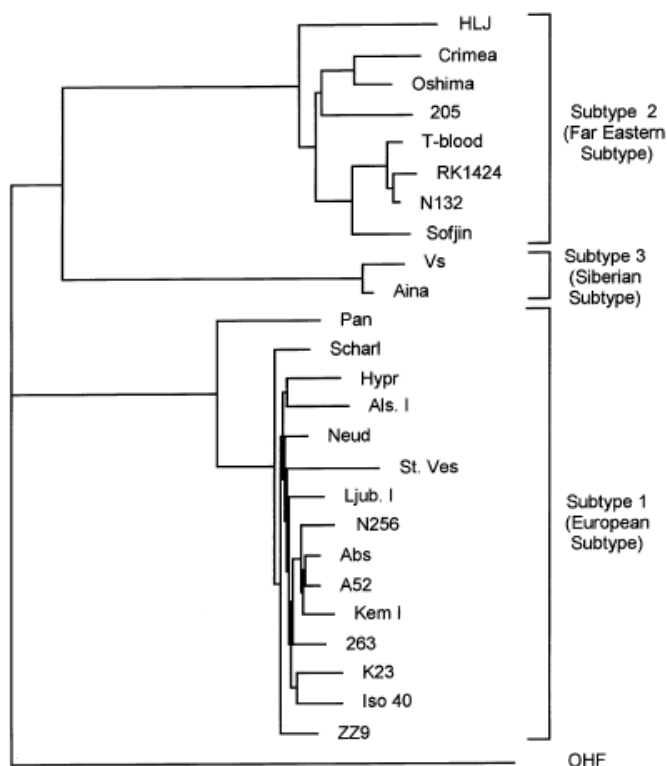
Pučením nukleokapsidy do endoplasmatického retikula vznikají nezralé viriony obsahující heterodimery proteinů prM a E. Viriony jsou zde prvně detekovatelné pomocí elektronové mikroskopie. Partikule prochází buněčnou sekreční dráhou, glykoprotein E a prM jsou glykosylovány. Těsně před opuštěním buňky dochází ke štěpení proteinu prM buněčnou proteázou (obvykle furinem) na glykosylovaný zbytek pr a protein M. Vznikají tak zralé viriony obsahující protein M a homodimery glykoproteinu E, ležící paralelně s virovým obalem. Viriony opouští buňku a infikují další buňky (Mandl, 2005). Celý replikační cyklus TBEV je schematicky zobrazen na obrázku 6 (B).



Obrázek 6 Zde je vyobrazena (A) strukturní organizace a (B) replikační cyklus TBEV. (A) Levá polovina partikule zobrazuje nezralou virovou partikuli (obsahující obalové proteiny prM a E), pravá polovina zobrazuje zralý virion (obsahující proteiny M a E). Nukleokapsida je tvořena komplexem dimerů kapsidového proteinu C a virovou RNA. Převzato z (Mandl, 2005).

7. Subtypy viru klíšťové encefalitidy

Porovnáním aminokyselinové sekvence glykoproteinu E u 25 různých kmenů, bylo nalezeno 60 pozic, ve kterých se aminokyseliny jednotlivých kmenů lišily. Z těchto šedesáti se 30 vyskytovalo u více než jednoho kmene. Na základě komparativní analýzy aminokyselinové sekvence glykoproteinu E byl vygenerován fylogenetický strom rozlišující tři subtypy: evropský (EU, z ang. european) a dva navzájem více příbuzné subtypy: sibiřský (SI) a dálnovýchodní (FE, z ang. far-eastern) (viz obrázek 7). Byly nalezeny tzv. „signální“ aminokyseliny, tedy aminokyseliny na konkrétní pozici charakteristické, pro jednotlivé subtypy. Jediná pozice, která ve které měl každý subtyp jedinečnou aminokyselinu byla pozice 206 (EU - valin, SI – leucin, FE – serin). Odlišnost aminokyselinové sekvence glykoproteinu E se mezi subtypy pohybovala do 5,6 %. Pod jednotlivé subtypy spadá mnoho různých kmenů TBEV, které se mezi sebou liší pouze do 2,2 % aminokyselinové sekvence glykoproteinu E (Allison et al., 1999).



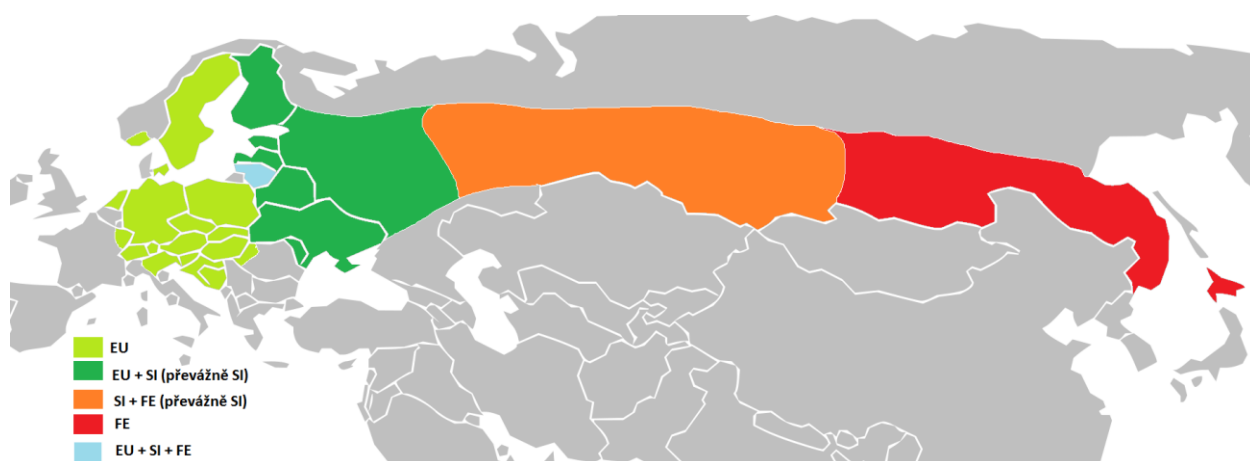
Obrázek 7 Rozdělení kmenů do subtypů na základě úrovně homologie aminokyselinové sekvence glykoproteinu E. Subtyp 1 (evropský subtyp), subtyp 2 (dálnovýchodní subtyp), subtyp 3 (evropský subtyp). Převzato z (Allison et al., 1999).

V roce 2007 však byla provedena fylogenetická studie, která byla založena na porovnání úrovně homologie aminokyselinové sekvence proteinu NS3 jednotlivých klíšťů přenášených flavivirů. Protein NS3 byl zvolen z toho důvodu, že fylogenetický strom vygenerovaný na bázi jeho aminokyselinové sekvence se téměř shodoval s fylogenetickým stromem vygenerovaným na základě aminokyselinové sekvence celého polyproteinu virů.

Výsledný fylogenetický strom obsahoval druh Tick-borne encephalitis virus, do nějž ovšem nově spadaly čtyři subtypy: virus louping ill, západní TBEV (současný evropský subtyp TBEV), východní TBEV (obsahující subtypy sibiřský a dálnovýchodní) a virus turecké encefalitidy ovčí (včetně viru řecké encefalitidy koz) (Grard et al., 2007).

Dále se ovšem většinou užívá původní rozlišení z roku 1999 na subtypy TBEV: evropský, sibiřský a dálnovýchodní (jejich rozšíření je graficky znázorněno na obrázku 8) (Allison et al., 1999). Různé následky infekce jednotlivými subtypy (EU, SI, FE) jsou shrnuty v tabulce 2, kapitola Klíšťová encefalitida.

V Litvě byla prokázána ko-cirkularizace všech tří subtypů TBEV (Lundkvist et al., 2001).

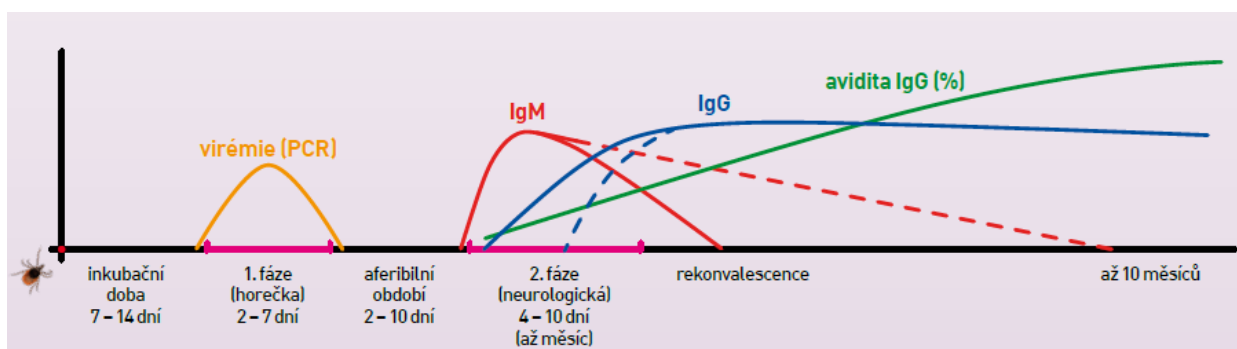


Obrázek 8 Rozšíření subtypů TBEV. EU značí evropský subtyp, SI sibiřský a FE dálnovýchodní. V tmavě zelené oblasti pravděpodobně také existují i přírodní ohniska FE subtypu. Zpracováno dle (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012; Kovalev et al., 2010, 2009; Takashima et al., 1997).

8. Detekce viru klíšťové encefalitidy

Infekci TBEV u pacienta lze prokázat dvěma přístupy. Pomocí metod přímých, kdy je v séru detekována přítomnost viru, či pomocí metod nepřímých, díky kterým lze v séru pacienta detekovat specifické protilátky proti TBEV. Přímé metody diagnostiky jsou v praxi využitelné v období virémie, tedy v průběhu 2-7 dní po skončení inkubační fáze (viz obrázek 9). Nepřímé metody diagnostiky jsou v tomto období nevyužitelné, jelikož sérokonverze začíná teprve na počátku druhé fáze infekce (viz obrázek 9). Oba typy metod mají své výhody a nevýhody, které budou dále diskutovány (viz tabulka 6).

Diagnostika TBEV je velice podstatná v mnoha různých oblastech. Může nejen pomoci stanovit diagnózu klíšťové encefalitidy u pacienta, ale také například potvrdit úspěšnou sérokonverzi u vakcinovaného jedince. Diagnostické metody lze rovněž využít k detekci TBEV v hlodavcích pro tzv. epizootický průzkum, díky němuž lze mapovat přírodní ohniska výskytu TBEV. Také mohou pomoci zjistit, zda je mléko hospodářských zvířat například na výrobu nepasterizovaných mléčných produktů bezinfekční.



Obrázek 9 Graf znázorňující období virémie a moment sérokonverze při infekci TBEV. Převzato z (Vidia, ©2014a, online). .

8.1 Zdroje vzorku

Zdroj vzorku je vhodné vybrat dle účelu diagnostiky. V případě klinické diagnostiky je obvykle využíváno sérum, či mozkomíšní mok pacienta (CSF, z ang. cerebro-spinal fluid). Pro potvrzení úspěšné imunizace bývá též využíváno sérum. Sérum je také využíváno pro epizootický výzkum. Dále je možné detekovat TBEV přímo v prisátém klíštěti. Existují komerční laboratoře, kam lze klíštět zaslat a získat výsledky diagnostiky infekcí, které klíště přenášelo (Protean, s.r.o, © 2008–2017, online). Přítomnost viru v klíštěti však nemusí nutně znamenat, že se klíšťová encefalitida rozvine u hostitele. Na přítomnost TBEV lze také testovat mléko hospodářských zvířat. U fatálních případů TBE, či u inokulovaných myší lze také zkoumat mozek post-mortem.

Ve všech případech lze obvykle využít metody PCR, či ELISA (Ergunay et al., 2016). Pokud je sérum, či CSF zdrojem vzorku, je na diagnostiku TBE výhodnější spíše ELISA. Například detekce virové RNA

v CSF pomocí PCR se ukázala být opakovaně dosti neúspěšná, zatímco detekce specifických protilátek v CSF je možná téměř všech pacientů (kolem 20. dne infekce) (Günther et al., 1997; Saksida et al., 2005).

8.2 Metody přímé detekce viru klíšťové encefalitidy

Metodami přímými je ve vzorku detekována virová RNA pomocí PCR (polymerase-chain reaction), či přítomnost viru pomocí izolace virových partikulí. Tyto metody mají ovšem mnoho nevýhod. Jsou poměrně nákladné a vyžadují specifické nástroje. Práce s infekčním virem též požaduje úroveň 3 technického zabezpečení laboratoře (BSL 3, z ang. biosafety level) (Directive 2000/54/EC of the European parliament and of the council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC), 2000). Přímé metody lze navíc využít pouze ve velice krátkém období viremické (časné) fáze infekce, jelikož později v séru virovou RNA, či virus v detekovatelném množství již nalézt nelze. Z toho důvodu se v klinické diagnostice více využívá nepřímých metod diagnostiky klíšťové encefalitidy (Clement et al., 2016; Holzmann, 2003). Metody přímé diagnostiky jsou vhodné například pro detekci virové RNA v infikovaných klíšťatech, či v nervových tkáních post-mortem.

8.2.1 PCR (Polymerase-chain reaction)

Detekce pomocí PCR je založena na amplifikaci virové RNA pomocí specifických primerů. Využívá se RT (reverse transcription) PCR, obvykle typu real-time PCR, či nested PCR.

Amplifikaci virové RNA předchází izolace RNA fenol-chloroformovou extrakcí, či formou, v současnosti již často využívaných, komerčních kitů (Achazi et al., 2011; Biernat et al., 2014). Izolovaná virová RNA je nejprve přepsána do cDNA a dále amplifikována (Green et al., 2012).

Při real-time PCR bývá cDNA pro upřesnění amplifikované sekvence označena sekvenčně specifickou hydrolyzační sondou (např. TaqMan). Jakmile je virová cDNA replikována, odbourává Taq polymeráza svou 5'-3' exonukleázovou aktivitou hydrolyzační sondu, která následně emituje fluorescenční záření. Naměřená fluorescence je přímo úměrná množství amplifikované virové cDNA (Schwaiger and Cassinotti, 2003).

V případě nested PCR je pro konkretizaci amplifikované sekvence využíváno nejprve jednoho páru primerů a poté dalšího upřesňujícího interního páru primerů (Biernat et al., 2014). Riziko kontaminace je ovšem ještě vyšší, než u real-time PCR (Donoso Mantke et al., 2007; Ergunay et al., 2016).

Bylo navrženo mnoho primerů dle různých sekvencí v genomu TBEV, dle sekvencí glykoproteinu E (Muto et al., 2015), nestrukturních proteinů NS1 (Achazi et al., 2011), NS3 a NS5 (Biernat et al., 2014a; Katargina

et al., 2013), ale také dle 3'UTR a 5'UTR (Puchhammer-Stöckl et al., 1995; Schwaiger and Cassinotti, 2003).

V současné době byly vyvinuty též metody, které dovedou odlišit jednotlivé subtypy TBEV jako např. RT-LAMP (reverse transcription loop-mediated isothermal PCR). RT-LAMP využívá šestice primerů (2 vnější, 2 interní, 2 loop-specifické) specifických ke konzervativní sekvenci TBEV v NS1 proteinu. Ke specifické amplifikaci jednotlivých subtypů užívá dále šestice primerů (2 vnější, 2 interní, 2 loop-specifické) navržených dle sekvencí charakteristických pro jednotlivé subtypy na genu pro glykoprotein E. Amplifikace jednoho vzorku trvá pouhých 50 minut a jelikož metoda probíhá za konstantní teploty, není zapotřebí drahého vybavení.

V současnosti jsou již též komerčně dostupné kity na celý proces RT-PCR pro diagnostiku TBEV (všech tří subtypů), využitelné však jen pro laboratorní účely (Techne[®] qPCR test Tick borne encephalitis virus – polyprotein gene, či Primerdesign[™] LTD Tick borne encephalitis virus – polyprotein gene, genesig[®] Advanced kit).

Výhodou PCR je, že lze tuto metodu využít již v časně (viremické) fázi infekce a také stačí malé množství vstupního materiálu (tedy kopií virové RNA ve vzorku). Další výhodou je, že amplifikovanou cDNA je možné identifikovat pomocí sekvenace. Je tedy možné pomocí konkrétních počítačových programů amplifikovanou nukleotidovou sekvenci porovnat s již známými sekvencemi TBEV zanesenými například v GeneBank (Achazi et al., 2011).

8.2.2 Izolace virových partikulí

Izolace viru probíhá obvykle formou kultivace viru. Výchozí materiál (může jím být např. klišť, či krev pacienta) je homogenizován, a po úpravě (supernatant) injikován intracerebrálně do sajících myších mláďat (Avsic-Zupanc et al., 1995), nebo jím jsou inokulovány TBEV-senzitivní CV-1 (*Cercopithecus Aethiops* kidney cells), či BHK (baby hamster kidney cells) buňky (Avsic-Zupanc et al., 1995; Muto et al., 2015). Po projevení příznaků se, v případě myší, odebere mozek, který se dále homogenizuje a je možné z něj virus izolovat izopyknickou centrifugací. V případě buněčných kultur lze snadno odebrat médium v němž je virus obsažen. Tato metoda se obvykle v diagnostice TBEV nevyužívá, jelikož je velice nespecifická, využívá se zvláště k namnožení viru k dalším experimentům, k přípravě antigenu pro nepřímé diagnostické metody, či k následnému zobrazení viru pomocí elektronové mikroskopie.

8.3 Metody nepřímé detekce viru klíšťové encefalitidy

Metody nepřímé detekce TBEV jsou založené na detekci specifických protilátek (IgM, či IgG) pacienta proti TBEV. Diagnostické okno (tedy období od počátku infekce k momentu, kdy lze virus metodou detekovat) je oproti přímým metodám diagnostiky delší, obvykle asi 10 dní. Pacienti však ke svému lékaři dochází obvykle až na počátku neurologické fáze, takže přímými metodami virus již zachytit nelze (Holzmann, 2003; Litzba et al., 2014). Proto se častěji ke klinické diagnostice TBEV využívá metod nepřímých. Jsou také častěji využívány v epizootických studiích.

U klinických případů se obvykle odebírá párový vzorek (zvláště séra). První odběr je proveden v akutní fázi a druhý v rekonvalescentní fázi, infekce je potvrzena, pokud je zaznamenán nárůst titru anti-TBEV specifických protilátek (obvykle čtyřnásobný) (Holzmann, 2003).

Obvykle využívanými nepřímými metodami detekce jsou virus neutralizační test (VNT/NT), komplement-fixační test (CF), hemaglutinačně inhibiční test (HI), western blot (IB, či WB), ELISA (z ang. enzyme-linked immunosorbent assay) a imunofluorescence (IFA). ELISA, IFA a WB jsou metody schopné rozlišit IgM a IgG protilátky, což je výhodné pro stanovení diagnózy (viz tabulka 5). Stanovení množství IgM protilátek může vést částečně k rozlišení mezi jedinci s akutní infekcí (s vysokými titry IgM protilátek) a jedinci s jinou flavivirovou infekcí, či jedinci očkovánými proti TBE (s nízkými titry IgM protilátek) (Stiasny et al., 2012). Pro upřesnění diagnostiky je také možné provést test avidity IgG protilátek, který ověřuje pevnost vazby antigen-protilátka (Holzmann et al., 1996, NRL pro arboviry ČR).

UNT, CF a HI se využívá k detekci protilátek teplem inaktivované sérum (aby byl inaktivován komplement a případné patogeny v séru pacienta). Určité množství IgM protilátek může být však teplem degradováno, z toho důvodu se předpokládá, že detekovány jsou zvláště IgG protilátky (Ytrehus et al., 2013).

Výsledky diagnostiky TBEV dle přítomnosti specifických anti-TBEV IgM a IgG protilátek				
IgM	+	-	+	-
IgG	+	-	-	+
Výsledek	Prokázaná infekce TBEV (pokud nebyl pacient nedávno očkovan).	Může být negativní (je zapotřebí kontrolního vzorku, je možné, že se jedná o časnou fázi TBE).	Podezření na TBE, je zapotřebí kontrolního vzorku.	Imunita/úspěšná vakcinace (výjimky: pasivní imunizace, selhání vakcinace, zkříženě reaktivní protilátky)

Tabulka 5 Tabulka shrnuje závěry diagnostiky TBE dle přítomnosti anti-TBEV specifických IgM a IgG protilátek ve vzorku. Zpracováno dle (Holzmann, 2003).

Nepřímé metody detekce TBEV jsou často levnější na výbavu, a tak na jejich bázi bývají často založené i komerční kity, a to zvláště na principu metody ELISA (Niedrig et al., 2007).

Mají však samozřejmě také své nevýhody. Zásadním problémem nepřímých metod detekce TBEV je zkřížená reaktivita TBEV-specifických protilátek a protilátek specifických proti jiným druhům flavivirů. Glykoprotein E různých druhů flavivirů obsahuje totiž podobné antigenní oblasti. Z toho důvodu se na něj s nižší pevností mohou vázat též jiné protilátky specifické proti flavivirům (než anti-TBEV) (Stiasny et al., 2006).

Diagnostika anti-TBE specifických protilátek u pacientů, kteří si prošli infekcí nějakým druhem flaviviru, či proti němu byli očkováni, může být tedy komplikovaná a často vykazuje falešně pozitivní výsledky. Tento problém v současné době stoupá na významu, jelikož obliba cestování do tropických destinací, kde mohou být endemické jiné flaviviry, roste.

8.3.1 Neutralizační test (ang. virus neutralization test, NT/VNT)

Neutralizační test je založen na detekci tzv. neutralizačních protilátek. Jedná se o jistou frakci protilátek, která je schopna nejen s virem interagovat, ale též ho obalit, a tak mu fyzicky zabránit v navázání na buněčný receptor či jinak zabránit infekci, tedy ji neutralizovat. Řada protilátek, které vykazují zkříženou reaktivitu proti flavivirům, nevykazuje neutralizační aktivitu a neutralizační test tak může být použit pro potvrzení infekce TBEV. Experimentálně bylo také prokázáno, že v obvyklých případech je množství naměřených anti-TBEV specifických IgG protilátek úměrné množství neutralizačních protilátek v séru (Holzmann et al., 1996) .

Při neutralizačním testu je do mikrotitrační destičky, která obsahuje virus (TBEV) přidáno inaktivované sérum (zbavené pacientova komplementu). Po krátké inkubaci jsou přidány buňky, které jsou na virus citlivé, např.: Vero buňky (Vene et al., 1998). Pokud jsou v séru obsaženy neutralizační protilátky proti TBEV, obalí virus, a tak mu stericky zabrání v interakci s buňkami. To vede ke snížení tvorby cytopatického efektu, který je po několika dnech (obvykle čtyřech - šesti) pod mikroskopem sledován (Holzmann et al., 1996).

Neutralizační test je považován za nejvíce specifickou nepřímou metodu diagnostiky, která téměř nevykazuje falešně pozitivní výsledky. Záleží však na konkrétním protokolu provedení neutralizačního testu, který se často laboratoř od laboratoře liší (Litzba et al., 2014).

Neutralizační test bývá využíván zvláště ve speciálních případech TBE, například u pacientů, kteří prodělali infekci jiným typem flaviviru, či proti němu byli očkováni. Jako potvrzovací diagnostická metoda je také využíván v oblastech, kde je endemických více druhů flavivirů (např. Japonsko – TBEV a virus japonské encefalitidy).

Nevýhodami této metody jsou poměrně vysoká časová náročnost a nutnost BSL3 laboratoře, ve které je neutralizační test prováděn, jelikož se zachází s infekčním virem. Specifita neutralizačního testu je však

jedinečná a z toho důvodu byly vyvíjeny metody na podobném principu, které jsou časově méně náročné (Vene et al., 1998).

8.3.2 Komplement fixační test (ang. complement fixation test, dále CF)

Princip komplement fixačního testu je založen na fixaci komplementu do imunokomplexu s antigenem a s protilátkami pacienta. Inaktivované sérum (zbavené pacientova komplementu) pacienta se inkubuje s virem a s předem stanoveným množstvím komplementu. Poté jsou přidány červené krvinky. Pokud jsou protilátky v séru pacienta přítomny, je komplement vyváznán, krvinky tedy nelyzují. Pokud však nejsou protilátky přítomny vůbec, pak dochází k hemolýze (Vidia, © 2014b, online).

Výhodou této metody je, že není náročná ani z hlediska vybavení, ani z hlediska časového. Pro diagnostiku TBEV ovšem není dostatečně citlivá ani specifická, výsledky se zřejmě též liší dle zdroje komplementu (Sethi et al., 1981). CF také nedokáže rozlišit mezi IgM a IgG protilátkami v séru.

8.3.3 Hemaglutinačně inhibiční test (ang. hemagglutination inhibition assay, dále HI)

Principem HIA je inhibice hemaglutinace. K různým ředěním inaktivovaného (komplementu zbaveného) pacientova séra je přidáváno konkrétní množství viru (virový standard). Po inkubaci jsou přidány červené krvinky. Pokud jsou v pacientově séru přítomny protilátky, nedochází k hemaglutinaci, krvinky tedy usednou na dno jamky (Wu et al., 2016).

Tato metoda není příliš náročná ani časově, ani na vybavu. Proto byla zvláště historicky velice často využívána. HI je využívána doposud, jelikož výsledné titry protilátek dobře korelují s titry naměřenými pomocí neutralizačního testu (Venturi et al., 2006). Oproti novější ELISA metodě je ovšem méně specifická (Lukman et al., 2016).

8.3.4 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Metoda ELISA funguje na principu detekce specifických IgM, IgG protilátek v séru (nepřímá ELISA), či přítomnosti antigenu v séru (přímá ELISA) pomocí enzymaticky značené protilátky. Dle toho, co je cílem detekce se uspořádání ELISA testu liší. Při detekci klíšťové encefalitidy se obvykle využívá nepřímého ELISA testu.

Antigen je na mikrotitrační destičky ukotven přímo, či skrze specifickou monoklonální protilátku. Dále je přidáno pacientovo sérum. Po inkubaci je přidána enzymaticky značená sekundární protilátka specifická proti lidské IgM, či IgG protilátce. Pokud jsou v séru pacienta přítomny protilátky proti TBEV, vytvoří se komplex antigen-primární protilátka-sekundární protilátka (enzymaticky značená). Přidání substrátu, jehož přeměna je katalyzována enzymem navázaným na sekundární protilátce, poté vede ke změně barvy.

Uspořádání však může být též takové (obvykle u IgM ELISA), že sekundární anti-IgM protilátka je navázána na destičce, poté je přidáno sérum a jako poslední je buď přidán antigen, a následně enzymaticky značená antigen-specifická protilátka, či může být přidán přímo enzymaticky označený antigen. Přidání substrátu opět vede ke změně barvy (Sino Biological Inc, © 2004 - 2017, online).

ELISA je snadná, finančně poměrně nenáročná metoda, k jejímuž vyhodnocení je zapotřebí pouze spektrofotometru. Oproti výše zmíněným metodám (CF, HI, NT) je využitelná k rozlišení přítomnosti IgM, či IgG protilátek v séru. Citlivost a specifita metody jsou vysoké, obvykle se odlišují zvláště dle využitého antigenu a způsobu jeho přípravy (Ikawa-Yoshida et al., 2011).

Zásadní nevýhodou metody ELISA jsou stejně jako téměř u všech nepřímých metod diagnostiky TBEV (kromě NT) falešně pozitivní výsledky vznikající kvůli detekci zkříženě reaktivních protilátek (Allwinn et al., 2002). Toto je ovšem záležitost, které se do určité míry daří předcházet různými přístupy (viz kapitola Výběr a příprava antigenu na ELISA).

8.3.5 Imunofluorescence (ang. Immunofluorescence assay, dále IFA)

IFA je založena na stejném principu jako ELISA, protilátky jsou ovšem značeny fluorescenčně. K interpretaci výsledku je tedy zapotřebí fluorescenčního mikroskopu. Jedná se o též poměrně často využívanou metodu, která dokáže rozlišit IgM a IgG protilátky.

8.3.6 Imunoblot (ang. Western Blot, dále WB, IB)

Imunoblot je proveden například takto, buňky, v nichž je antigen produkován jsou narušeny a elektroforeticky separovány. Gel je přebíjen na nitrocelulózovou membránu. Poté se membrána inkubuje se sérem pacienta a následně s např. enzymaticky značenou sekundární protilátkou (Zeman et al., 2007). Po přidání substrátu dochází k vývoji signálu, který lze zachytit.

8.3.7 Test avidity IgG protilátek

Tento test je výhodné využít na zjištění pevnosti vazby antigen-protilátka. Takto je možné zjistit nakolik je vazba IgG protilátky na antigen specifická. IgG protilátky očkovaných jsou např. více specifické než IgG protilátky pacientů v akutní fázi, a tak můžeme podobné vzorky odlišit.

Obvykle se metoda používá ve spojení s klasickou ELISA. Použity jsou pro kontrolu párové jamky. Výsledný komplex je krátce inkubován s denaturačním činidlem (ureou, obvykle 7M v PBS). Slabší vazby mezi protilátkou a antigenem povolí a protilátky se odmyjí. Závěrem je porovnáván signál z jamky bez inkubace s ureou se signálem z jamky inkubované s ureou (Gassmann and Bauer, 1997; Zelená et al., online).

V současnosti lze již na českém trhu nalézt komerční ELISA kity s testem avidity IgG protilátek (ELISA-VIDITEST anti-TBEV avidity IgG; Vidia, Vestec) (Vidia, 2014a, online).

Následující tabulka shrnuje výhody a nevýhody jednotlivých, výše stručně představených klasických metod diagnostiky TBEV. Znázorňuje též zdroje vzorků, které jsou pro jednotlivé metody vhodné.

TABLE 1. OVERVIEW OF LABORATORY TECHNIQUES FOR TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS DIAGNOSIS

	<i>Samples^a</i>					<i>Performance</i>	
	<i>Blood</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	<i>Tissue</i>	<i>Milk</i>	<i>Tick</i>	<i>Advantages</i>	<i>Disadvantages</i>
Virus isolation	+	(+)	+	+	+	Provides infectious virus for detailed characterization and further research.	Low sensitivity. Technically demanding. Appropriate biosafety conditions required.
Electron microscopy	–	–	+	–	+	Can be employed for direct visualization of the virus in infected tissues or cell culture.	Requires high number of virions. Technically demanding. Little or no impact on diagnosis.
Nucleic acid tests	+	(+)	+	+	+	High sensitivity and specificity. Quantification possible. Subtype detection possible. Partial sequence characterization possible.	Technically demanding. Relatively expensive. Extraction–purification step required. Limited diagnostic impact in late disease.
Serology HI, CF	+	+	–	–	–	Historically used for diagnostics and characterization of antigenic relationships among viruses.	Increased antibody titers in acute and convalescent sera required for diagnosis. Group-specific antigens detected. Cross reactions among flaviviruses.
ELISA, IFA, IB	+	+	+ ^b	+	+ ^b	Rapid, less expensive, easy to perform. Single specimen can be employed for diagnosis. Quantification possible. Antibody subtype determination possible (IgM, IgG, IgA). Antigen detection possible.	Cross-reactions among flaviviruses. Variations of sensitivity/specificity in commercially available assays.
VNT	+	+	–	+	–	Gold standard for specificity.	Technically demanding. Appropriate biosafety conditions required.

Tabulka 6 Tabulka shrnuje výhody a nevýhody jednotlivých diagnostických metod a zároveň ukazuje zdroje vzorku vhodné a nevhodné pro konkrétní metody.

(a) + či (+): zaznamenaný, či možný; –: nezaznamenaný, nepravděpodobný, (b) antigen-detekující metody

CF, komplement fixační test; ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay); HI, hemaglutinačně inhibiční test; IB, imunoblot; IFA, imunofluorescence; Ig, imunoglobulin; VNT, neutralizační test

8.4 Diagnostické metody využívané v Evropě

V tabulce 7 je shrnuto, jaké diagnostické metody jsou využívány pro diagnostiku viru klíšťové encefalitidy v rámci zemí EU a EFTA (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012). Jak je z tabulky patrné, nejvíce využívanými metodami diagnostiky TBEV jsou v současnosti PCR a ELISA. Jejich výhodou je zajisté široké spektrum zdrojů vzorku, které lze využít.

Stát	Nepřímá detekce						Přímá detekce		
	ELISA	IFA	HI	CF	IB	VNT	RT-PCR	VI	SEQ
Rakousko	•		•			•	•	•	•
Belgie	•						•		
Bulharsko	•			•			•	•	•
Česká republika	•	•		•		•	•	•	
Dánsko	•						•		
Estonsko	•								
Finsko	•		•						
Francie	•	•				•	•	•	•
Německo	•	•	•			•	•	•	•
Maďarsko	•	•	•			•	•	•	•
Irsko	•								
Litva	•						•		
Lotyšsko	•	•							
Holandsko	•								
Norsko	•	•					•		•
Polsko	•								
Rumunsko	•								
Slovensko	•			•		•	•		
Slovinsko	•			•			•	•	
Španělsko	•						•		•
Švédsko	•					•	•	•	•
Švýcarsko	•	•					•		
Velká Británie	•				•		•		
Celkem	23	7	4	4	1	7	16	8	8

Tabulka 7 Tabulka shrnuje diagnostické metody využívané v jednotlivých zemích EU a EFTA k diagnostice v letech 2000-2010. Zpracováno dle (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012).

Diagnosticky výhodnější v klinické oblasti se zdá být metoda ELISA, jelikož pacienti s klíšťovou encefalitidou dochází za svými lékaři obvykle až na počátku neurologické fáze infekce, kdy už není možné v krvi detekovat virus. Navíc je k vyhodnocení této metody je zapotřebí pouze spektrofotometru.

Vzhledem k výhodám, které ELISA poskytuje, proběhlo mnoho studií zabývajících se problémem zkřížené reagujících protilátek. Bylo prokázáno, že výběr, příprava a ukotvení antigenu na mikrotitrační destičky jsou klíčové faktory, vedoucí ke snížení až k eliminaci falešně pozitivních výsledků ELISA testu.

9. Výběr a příprava antigenu na ELISA

Jak již bylo zmíněno ELISA má mnoho výhod: relativně levné provedení, možnost rozlišení IgM a IgG protilátek a možnost aplikace testu avidity IgG protilátek. Nevýhodami jsou falešně pozitivní výsledky vzniklé detekcí protilátek zkříženě reagujících mezi flaviviry, ale také doposud potřebná úroveň 3 technického zabezpečení (BSL3) pro přípravu ELISA antigenů.

Komerční ELISA kity obvykle využívané v diagnostice TBE, využívají jako antigen celé viriony TBEV inaktivované formaldehydem zakotvené přímo na dno mikrotitračních destiček (TBE FSME IgG ELISA) (Obara et al., 2006). Výroba inaktivovaných virionů je velice pracná, časově náročná a vyžaduje prostředí laboratoře BSL3. Výběr subtypu TBEV pro výrobu antigenu většinou nehraje roli, jelikož protilátky rozeznávají všechny tři subtypy TBEV (Yoshii et al., 2003).

Komerční ELISA kity vykazují často falešně pozitivní výsledky u pacientů s protilátkami proti jiným flavivirům (Allwinn et al., 2002; Niedrig et al., 2007). A jelikož obliba tropických destinací stoupá, lidé se před cestováním nechávají očkovat např. proti viru žluté zimnice či proti viru japonské encefalitidy (JEV) (proti viru dengue a viru West Nile doposud dostupná vakcína není) (Mansfield et al., 2011). Může se také stát, že se při cestování jiným flavivirem nakazí, nebo se jím nakazili již v minulosti. Proto je vhodné před testem zjistit, zda byl pacient v minulosti očkovan, či infikován nějakým druhem flaviviru (Allwinn et al., 2002). V některých oblastech je také endemických více druhů flaviviru. Je tak stále zapotřebí metody na ujasnění nespecifických výsledků, kterou obvykle bývá NT. NT je ovšem využitelný opět jen v laboratořích s BSL 3 a je časově, finančně i pracovníčně náročný.

Právě z těchto důvodů vzniklo mnoho studií, které se zabývaly alternativou využití formaldehydem inaktivovaného viru jako ELISA antigenu, aby vyřešili oba výše zmíněné problémy: zkříženou reaktivitu protilátek a nutnost BSL 3 k výrobě antigenu.

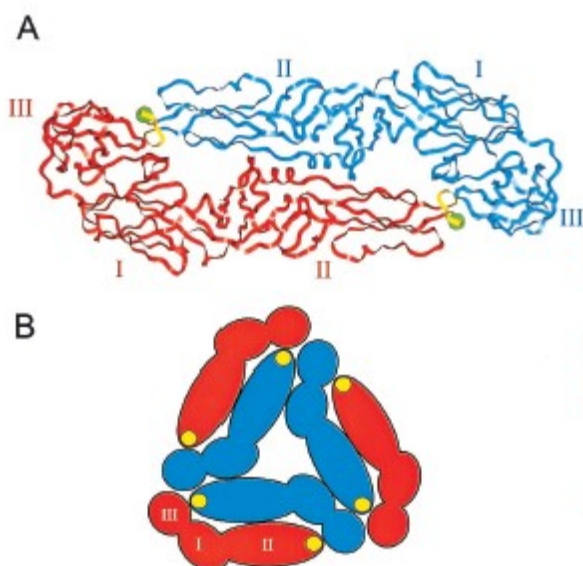
9.1 Antigenní epitopy

Glykoprotein E je situován na povrchu virionu a z toho důvodu je hlavním cílem neutralizačních protilátek. Infekcí, či imunizací TBEV vznikají dvě skupiny protilátek: protilátky, které mají potenciál neutralizovat příbuzné viry (pokud je homologie aminokyselinové sekvence proteinu E virů nad asi 70 %) a protilátky, které nemají neutralizační aktivitu, jsou ale schopné inhibovat hemaglutinaci (pokud je homologie aminokyselinové sekvence proteinu E nižší) (Stiasny et al., 2006). Proto vznikly snahy mapovat antigenní epitopy, na které se vážou právě protilátky schopné neutralizace viru (Stiasny et al., 2006; Throsby et al., 2006).

Studie zabývající se antigenními epitopy flaviviru West Nile virus způsobujícího západonilskou horečku zjistila, že domény I a II glykoproteinu E vážou zvláště protilátky bez neutralizační aktivity. Doména III obsahuje malý počet epitopů, které ovšem vážou zvláště neutralizační protilátky (Throsby et al., 2006).

Další studie se zabývala zkříženě reaktivními epitopy glykoproteinu E se snahou zjistit, zda je možné nalézt konkrétní oblasti, na které se přednostně váží právě zkříženě reaktivní protilátky. Nebyly nalezeny konkrétní epitopy reagující pouze se zkříženě reaktivními protilátkami, bylo však zjištěno, že existují oblasti tzv. fusion peptide loop (fúzní smyčky, FP loop), které se vyskytují u všech flavivirů a jejich aminokyselinové sekvence jsou velmi konzervované. Při jejich expozici se váže více zkříženě reaktivních protilátek. Tyto FP loop spouští fúzi s membránou endozomu.

Studována byla FP loop na špičce domény II glykoproteinu E (viz obrázek 10). Za normálního pH je smyčka nepřístupná, ovšem po vystavení kyselému pH v endozomu je odhalena (Allison et al., 2001). Při její expozici byl zaznamenán nárůst vazby zkříženě reaktivních protilátek (Stiasny et al., 2006). Při hemaglutinačně inhibičním testu je virus pre-inkubován v kyselém pH, což může mít za následek právě odhalení FP loop a tedy zvýšenou vazbu zkříženě reaktivních protilátek (Allison et al., 1995).



Obrázek 10 Na obrázku vidíme A - domény homodimeru glykoproteinu E, označené římskými číslicemi a žlutě označenou Fusion loop. B - Na druhé části obrázku je trimerní forma glykoproteinu E po opůsobení kyselým pH. Převzato z (Allison et al, 2001).

Podstatný je zřejmě též způsob ukotvení antigenu na destičky. ELISA testy využívající antigen přímo ukotvený na destičky vykazují, oproti ELISA testům využívajícím tzv. capture (tedy uchycující) protilátku k uchycení antigenu na destičky, horší výsledky. Zvláštním typem IgM ELISA je tzv. μ -capture ELISA. V situaci, kdy byl antigen ukotven přímo na destičku by vznikala velká konkurence mezi vazbami IgG a IgM protilátek na antigen. Z toho důvodu bývá využita anti-IgM protilátka jako uchycující protilátka u IgM ELISA, což výrazně zvýšilo citlivost IgM ELISA (Heinz et al., 1981).

Také bylo experimentálně zjištěno, že inaktivace formalinem má pravděpodobně za následek pozměnění antigenicity některých epitopů, pravděpodobně kvůli zesíťování proteinů (Vani et al., 2006). Existují dokonce epitopy (např. E85/59 přítomný na doménách I a II glykoproteinu E), které rozeznávají pouze protilátky jedinců, kteří byli virem infikováni. Protilátky těch, kteří byli proti TBEV vakcinováni tyto epitopy nerozeznávají (Kuivanen et al., 2014).

Alternativou k nutnosti využití formalinu při výrobě antigenů na ELISA se stalo genové inženýrství a výroba antigenu v heterologních expresních systémech. Jako antigeny byly vyzkoušeny různé části glykoproteinu E, či subvirové partikule, které jsou při infekci přirozeně v malém množství produkovány (Schalich et al., 1996).

9.2 Glykoprotein E jako antigen pro ELISA

Již roku 2001 byla vytvořena ELISA, která využívala jako antigen glykoprotein E se zkráceným C koncem (Etr). Celý glykoprotein E se nedařilo v dostatečném množství izolovat, a tak byl jako antigen pro ELISA využit izolovaný Etr (Marx et al., 2001). Protein Etr byl produkován za využití rekombinantního bakuloviru (*Autographa Caliphornica nuclear polyhedration virus*) v buňkách *Spodoptera frugiperda* (Sf 21). Proteiny byly exprimovány s polyhistidinovým tagem na C-konci a byly purifikovány pomocí afinitní chromatografie. Antigen byl však ukotven přímo na destičky a výsledky v porovnání s komerční ELISA nebyly lepší, problémem však mohl být nesprávně složený protein. Zkřížená reaktivita protilátek nevymizela. Byl však navržen nový, levný způsob produkce antigenu, který nepodléhá BSL 3 (Marx et al., 2001).

V roce 2009 byla vyrobena ELISA využívající jako antigen doménu III glykoproteinu E (EdIII). Jak již bylo zmíněno, zjevně tato doména obsahuje malé množství epitopů, které však vážou převážně neutralizační protilátky (Throsby et al., 2006). Cílem využití EdIII jako ELISA antigenu bylo dosáhnout vyšší specifity snížením množství antigenních epitopů. Fragment glykoproteinu E (EdIII, 288 bp) s polyhistidinovým tagem byl klonován do plazmidu pET22b, jímž byly transfekovány bakterie *Escherichia Coli*. Ed III byl purifikován pomocí afinitní chromatografie v neredukčních podmínkách.

IgG ELISA byla provedena pomocí ukotvení antigenu přímo na destičky a IgM ELISA pomocí capture protilátky. IgM ELISA zde byla nazývána „IC ELISA“ (immunocomplex ELISA), jelikož sérum bylo preinkubováno s enzymaticky označeným antigenem, a tak vznikly imunokomplexy, které byly nanášeny na destičky pokryté anti-IgM protilátkami.

Citlivost IgG ELISA využívající EdIII byla pouhých 70 %, zatímco citlivost IC IgM ELISA byla celých 96 %. Specifita IC IgM ELISA byla 100 %. Snížením množství vazebných míst pro protilátky na antigenu pro účel zvýšení specifity se zřejmě snížila citlivost metody (Ludolfs et al., 2009).

Roku 2002 vyšla studie, která zjistila, že k produkci správně složeného glykoproteinu E je zapotřebí ko-exprese proteinu prM. Protein prM funguje coby chaperon (chaperon-like) a pomáhá tak glykoproteinu E zachovat si původní vlastnosti (Lorenz et al., 2002). Ko-exprese prM a E vede k produkci subvirových částic (SPs z ang.subviral particles) (Schalich et al., 1996).

9.3 Subvirové partikule jako antigen pro ELISA

Další alternativou inaktivovaných virionů, byly jako antigen využity subvirové částice, které jsou v určitém množství přirozeně produkovány buňkou v průběhu infekce TBEV (Schalich et al., 1996).

Subvirové částice (SPs) se skládají pouze z obalu virionu, obsahujícího proteiny M a E. Jelikož neobsahují kapsidu ani virovou RNA, jsou v průměru velké asi 30 nm, jejich vznášivá hustota je asi 1,14 g/cm³ (viz tabulka 8). SPs si zachovávají antigenicitu a schopnosti hemaglutinace a fúze s membránami vlastní virionům divokého viru (viz tabulka) (Schalich et al., 1996). SPs se zpočátku využívaly zvláště na studium struktury TBEV proteinů E a M. Ovšem vzhledem k tomu, že jsou velice podobné virionům divokého viru, byly brzy využity jako antigen pro metodu ELISA.

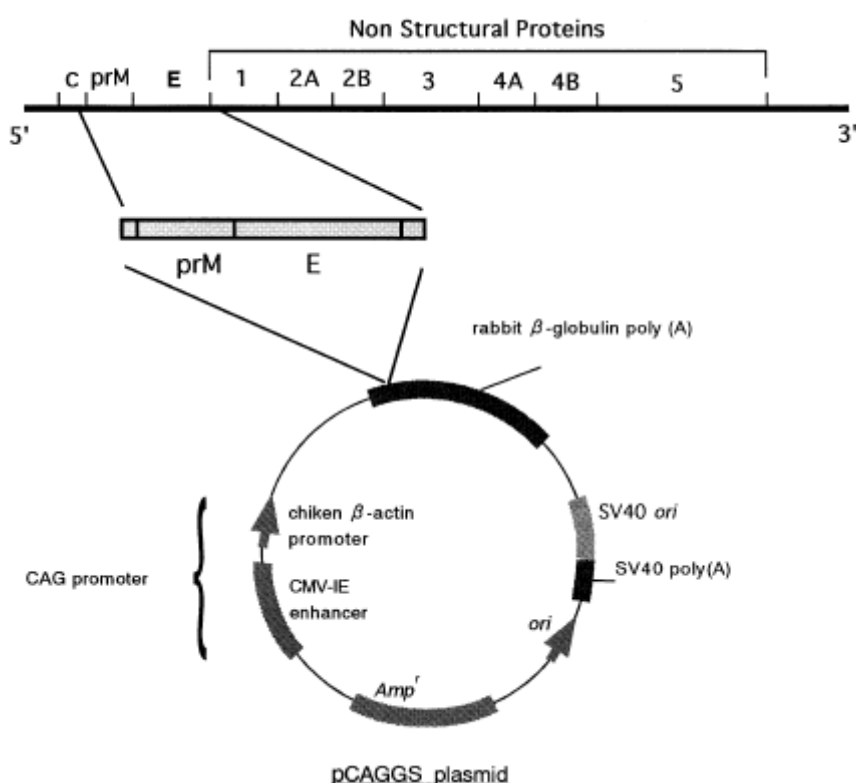
Porovnání vlastností rekombinantních subvirových částic (SPs) a viru			
Vlastnost		SPs	Virus
Fyzikální vlastnosti	<i>Průměr</i>	30 nm	50 nm
	<i>Hustota</i>	1,14 g/cm ³	1,19 g/cm ³
Složení	<i>Virové proteiny</i>	E,M	E,M,C
	<i>Typ oligosacharidu</i>	Složené	Převážně složité
	<i>Lipidová membrána</i>	Ano	Ano
	<i>Nukleová kyselina</i>	Málo, či žádná	Virová RNA
Oligomerní stav glykoproteinu E při	<i>pH 8,0</i>	Dimerní	Dimerní
	<i>pH 6,0</i>	Trimerní	Trimerní
Práh pH přechodu z dimerní na trimerní organizaci glykoproteinu E		6,5	6,5
Funkční aktivita	<i>Specifická HA aktivita</i> <i>HA titr při c(pr E) = 1 µg/ml</i>	128	128
	<i>Fúzní aktivita</i>	Ano	Ano

Tabulka 8 Porovnání vlastností SPs a viru. Zpracováno dle (Schalich et al., 1996).

V Japonsku, kde jsou endemické oba TBEV a JEV viry, se stále využívá neutralizačního testu k odlišení infekcí těmito flaviviry. Proto bylo příhodné zaměřit se na jiný způsob diferenciální diagnostiky k odlišení infekce TBEV, také proto zde byla roku 2003 byla vytvořena IgM a IgG ELISA využívající nový antigen

ve formě subvirových částic TBEV. Byl zkonstruován plazmid pCAGprME (viz obrázek 11), kterým byly transfekovány savčí buňky 293T. Výchozím kmenem TBEV pro výrobu plazmidu byl kmen Oshima 5-10 (FE subtyp) (Yoshii et al., 2003). Jako antigen byl při metodě ELISA využit lyzát transfekovaných buněk. U IgG ELISA byla na přichycení antigenu k mikrotitračním destičkám využita MAb 1H4 protilátka specifická ke glykoproteinu E TBEV, čímž se předešlo případným potížím, které vznikaly při přímém pokrytí destiček antigenem (Yoshii et al., 2003). IgM ELISA byla provedena jako μ -capture IgM ELISA. Byla testována séra vakcinovaných proti TBE.

ELISA byla porovnávána s komerčním ELISA testem Immunozyt FSME IgG/IgM (PROGEN BIOTECHNIK GmbH, Heidelberg, Germany), který využívá jako antigen inaktivovaný virus TBEV evropského subtypu (Yoshii et al., 2003).



Obrázek 11 Konstrukce rekombinantního TBEV plazmidu pCAGprME. Ve vrchní části obrázku je schematicky vyobrazen genom TBEV, ve spodní části jsou vyobrazeny základní části plazmidu pCAGGS. Uprostřed je zobrazen segment genomu TBEV, který byl klonován do plazmidu – oblast prM, E a 34 nukleotidů s NS1.

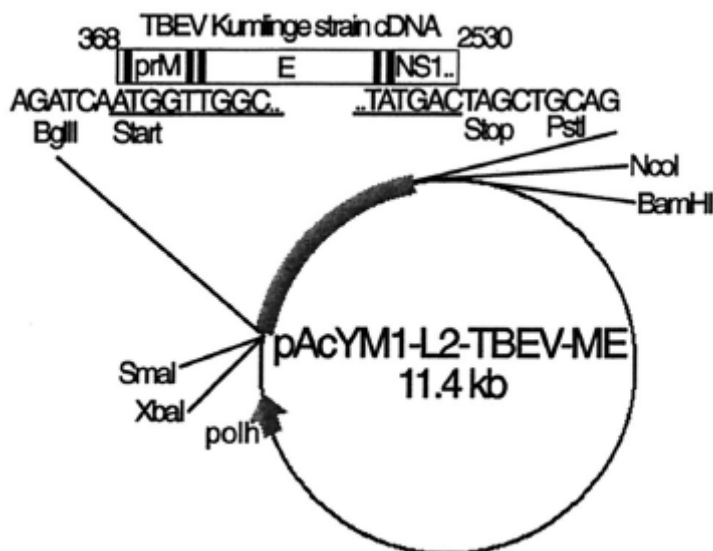
Převzato z (Yoshii et al., 2003).

Antigenní epitopy glykoproteinu E byly díky správnému skládání zřejmě uchovány. Tato ELISA testovala séra pacientů s japonskou encefalitidou (způsobenou flavivirem JEV) a všechna vyšla negativní na anti-TBEV specifické protilátky. Nový antigen zřejmě napomohl řešení problému s zkříženou reaktivitou (Yoshii et al., 2003).

Citlivost testu však nebyla příliš vysoká (IgM 87,7 %, IgG 80,7 %), což mohlo být způsobeno využitím lyzátu transfekovaných buněk jako antigenu, jelikož proteiny (prM a E) nebyly dostatečně zralé (Obara et al., 2006).

Ještě roku 2003 byla vyvinuta μ -capture IgM ELISA, kde sloužily přímo subvirové partikule jako antigen (supernatant infikovaných buněk). K produkci SPs byly využity bakuloviry v hmyzích Sf9 buňkách (viz obrázek 12), které ovšem vykazovaly poměrně malou expresi proteinů. Možnými komplikacemi byly také přítomnost rekombinantních životaschopných bakulovirů a typ glykosylace charakteristický pro hmyz.

Bylo však možné odlišit pacienty s dengue infekcí od pacientů s TBEV, protilátky tedy nereagovaly zkříženě. V porovnání s komerčním IgM ELISA testem byla citlivost metody 100 % a specifita 99 % (Jaaskelainen et al., 2003).

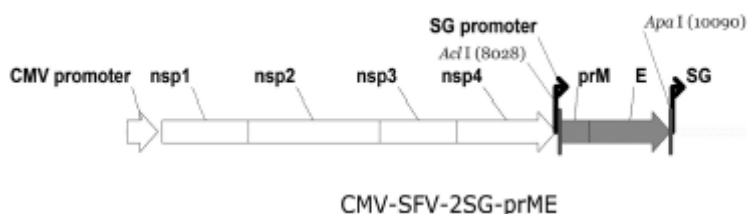


Obrázek 12 Konstrukce pACYM1-L2-TBEV-prME. Polh - polyhedrinový promotor. Podtržené - sekvence specifická pro kmen TBEV Kumlinge. Převzato z (Jaaskelainen et al., 2003).

Dále byly jako ELISA antigen využity SPs produkované stejným způsobem jako v Japonsku roku 2003 (293T buňky byly transfekovány plazmidem pCAGprME) (Yoshii et al., 2003). Jako antigen byl však využit ultracentrifugovaný supernatant trasfekovaných buněk. Využívána byla párová séra, tedy séra z akutní a z rekonvalescentní fáze, byl sledován nárůst titru protilátek. Výsledky byly porovnány s komerčním IgG ELISA kitem a také s výsledky neutralizačního testu. Výsledky IgG SPs ELISA prokazovaly 98,8% citlivost, 100% specifitu. Do studie byla zahrnuta séra deseti pacientů s infekcí JEV, která byla využita k testování případné zkřížené reaktivity protilátek, všechna však vyšla negativní (Obara et al., 2006).

V roce 2014 byl využit jako vektor plazmid CMV-SFV-2SG-prME, vytvořený z kmenu TBEV Karelia-94 (SI subtyp) (viz obrázek 13) odvozený od *Semliki forest virus* (SFV) replikonů, kterým byly infikovány Vero E6 buňky. Výhodou byla vysoká exprese heterologních proteinů s glykosylací savčího typu a snadná,

rychlá konstrukce rekombinantních molekul a využití plazmidu, který je RNA polymeráza II dependentní (Levanov et al., 2014). Byly vytvořeny IgM a IgG ELISA. Jejich výsledky byly porovnány s μ -capture IgM (Jaaskelainen et al., 2003), s komerčním ELISA kitem, s hemaglutinačně inhibičním testem a s IFA (využívajícím infikované buňky jako antigen). Citlivost IgG byla 98,7 % a její specifita byla 100 %. Citlivost IgM ELISA byla 97,4-100 % a specifita 100 % (Levanov et al., 2014).



Obrázek 13 Rekombinantní plazmid je odvozen od SFV replikonů, kódujících nestruturní proteiny (ns1-ns4) SFV a strukturní proteiny TBEV (prM a E). Transkripce z CMV promotoru generuje kompletní RNA s pozitivní polaritou. TBEV strukturní geny jsou pod kontrolou přirozeného SFV subgenomového promotoru. AclI a ApaI reprezentují specifické restrikční oblasti využívané při klonování prME genů TBEV (čísla nukleotidů odpovídají pozici těchto oblastí v rekombinantním plazmidu. Převzato z (Levanov et al, 2014)

9.4 Porovnání ELISA využívající SPs antigen a ELISA využívající EdIII antigen

Metody ELISA využívající EdIII jako antigen a ELISA využívající SPs jako antigen byly porovnány s neutralizačním testem. SPs byly vyrobeny jako dříve, 293T buňky byly transfekovány pCAGprME plazmidem, supernatant byl precipitován PEG, naředěn a využit jako antigen (Yoshii et al., 2003). Antigen EdIII byl vyroben podobně jako dříve, EdIII oblast byla vnesena do plazmidu, fúzována s NusA-tag proteinem (tag zvyšující rozpustnost proteinu) v kombinaci s polyhistidinovým tagem. Antigen EdIII byl izolován pomocí afinitní chromatografie. ELISA antigen EdIII byl ukotven přímo na destičky, zatímco SPs byly na destičky uchyceny skrze anti-TBEV-E IgG protilátku. Výsledky byly velice rozdílné. Zatímco citlivost a specifita EdIII ELISA byly 77,1 % a 80 %, citlivost a specifita SPs ELISA byly 91,4 % a 100 %.

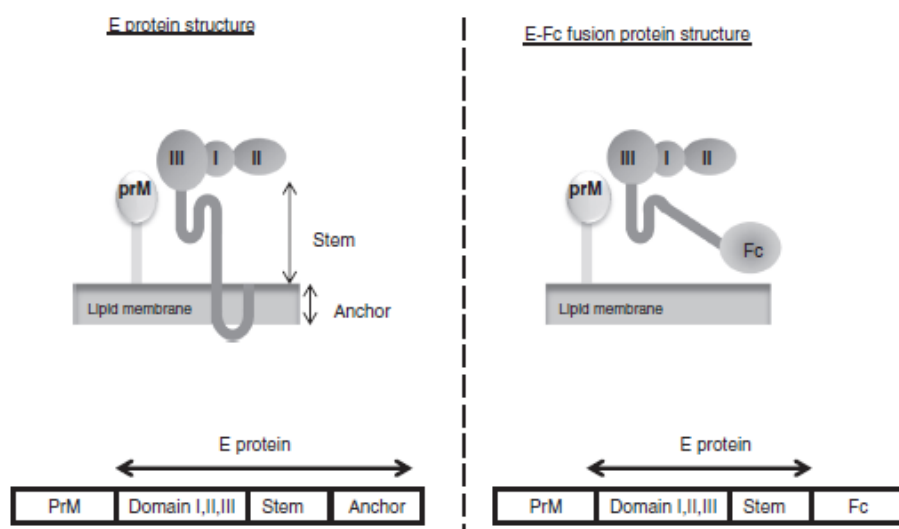
Zdrojem vzorku však nebyla tentokrát lidská séra, ale séra hlodavců. Epizootický průzkum je totiž vhodným způsobem k mapování ohnisek výskytu TBEV. (Ikawa-Yoshida et al., 2011).

9.5 Další vývoj

Dále bylo vytvořeno několik ELISA k využití u více živočišných druhů.

V roce 2014 byla vyvinuta ELISA, kterou lze využít jak u hlodavců, tak u lidí. Byl vytvořen plazmid (pCAGprME-449-Fc, viz obrázek 14), který exprimuje proteiny prM a E fúzané s Fc doménou králičí IgG protilátky (opět v 293T buňkách). Fc doména králičí IgG protilátky byla přidána k usnadnění purifikace glykoproteinu E, zároveň však zvyšuje stabilitu a expresi fúzaného proteinu. Fúze s králičí E doménou nenarušila interakci s prM, a tak vznikly správně složené homodimery E-Fc.

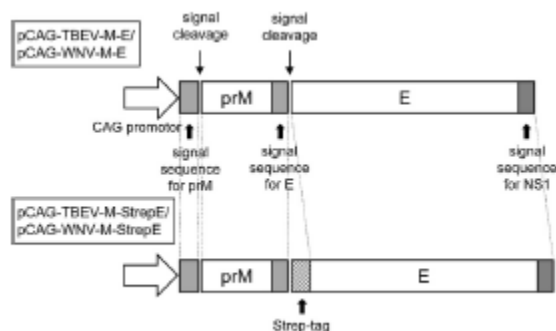
Supernatant transfekovaných buněk byl využit k imunoprecipitaci. ELISA antigen E-Fc byl přichycen skrze anti-králičí IgG protilátku, dále bylo přidáno sérum lidské, či hlodavčí a poté adekvátní enzymaticky značená sekundární protilátka. Citlivost a specifita se pohybovaly okolo 91 %, tato ELISA by mohla vhodná k využití u více živočišných druhů například jako metoda epizootického průzkumu (Chidumayo et al., 2014).



Obrázek 14 Konstrukce a exprese TBEV E-Fc fúzních proteinů. Vlevo původní uspořádání genů pro prM a E, Vpravo Kotvící transmembránová část proteinu E byla nahrazena Fc fragmentem králičí IgG protilátky. Převzato z (Chidumayo et al., 2014).

Využití ELISA u více živočišných druhů se rozvíjelo dále. Pro snazší izolaci a uchycení byly vyprodukovány SPs (kmen Oshima 5-10) se strep-tagem připojeným na N konci genu pro glykoprotein E (strep-tag je tag, který má vysokou afinitu vůči streptavidinu) (viz Obrázek 15). HEK293T buňky byly transfekovány plazmidem pCAG-TBEV-M-StrepE. Supernatant byl precipitován pomocí PEG. Výsledné SPs obsahovaly strep-tag na povrchu. Díky tomu bylo možné je jako ELISA antigen uchytit na mikrotitrační destičky pomocí Strep-Tactinu (Strep-Tactin byl vyvinut kvůli zlepšení vazebnosti streptavidinu). Po přidání séra byly případné anti-TBEV protilátky rozeznány A/G proteinem konjugovaným s peroxidázou. A/G je protein, který má Fc vazebné domény proteinu A i proteinu G. Kvůli širokému vazebnému spektru polyklonálních protilátek různých živočišných druhů je využíván

v sérologické diagnostice. Tuto ELISA lze právě díky A/G proteinu využít u velkého spektra živočišných druhů. Specifita a citlivost se však u různých druhů lehce odlišuje, obecně se ale pohybuje okolo 96 % (Inagaki et al., 2016).



Obrázek 15 Schematické zobrazení plazmidu, exprimujícího SPs se Strep-tagem. Strep-tag sekvence byla fúzována na N-konec proteinu E. Převzato z (Inagaki et al., 2016).

V nedávné době byl nalezen způsob, jak pomocí μ -capture IgM ELISA testu odlišit infekci evropským a sibiřským subtypem. Což může být výhodné vzhledem k tomu, jak se může lišit průběh infekce SI a EU subtypem TBEV. Jako antigen byly využity SPs evropského subtypu, kmen Kumlinge A52 (aEU) a SPs sibiřského subtypu (aSI), kmen Karelia-94. Závěrem byly porovnány hodnoty naměřené optické denzity při využití aSI a hodnoty OD při využití aEU. Index byl stanoven podílem OD při využití aSI OD při využití aEU jako antigenu, tedy aSI/aEU. Výsledná hodnota se pohybovala pro všechna séra pacientů s infekcí evropským subtypem pod 1,5, zatímco výsledná hodnota pro vzorky séra jedinců s infekcí sibiřským subtypem byla vždy nad 1,8. Tato ELISA by mohla být využívána při sérologickém vyšetření pacientů s TBE (Levanov et al., 2015).

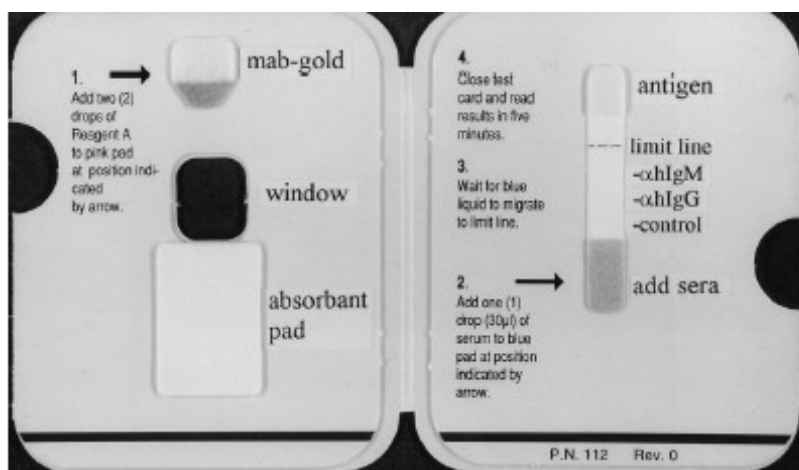
Byly také nalezeny epitopy, které jsou charakteristické pouze pro jedince infikované TBEV. Nalézají se na glykoproteinu E a nestrukturním proteinu NS5 (E-74, E-85, NS5-521). Očkování proti TBE tyto epitopy nerozeznávají. Využití takových epitopů jako ELISA antigen by mohlo vést k odlišení očkových a infikovaných jedinců (Kuivanen et al., 2014).

9.6 Dosud nevyužité možnosti budoucí diagnostiky viru klíšťové encefalitidy

U mnoha druhů flavivirů je využíván jako determinant raného stádia infekce protein NS1, který je pomocí elektrochemických metod kvantifikován v séru (také bývá využíván jako ELISA antigen) (Cecchetto et al., 2017; Chao et al., 2015). Nebylo však ještě vyzkoušeno, zda je tato metoda využitelná též pro diagnostiku TBE.

Ovšem stále je diagnostika klíšťové encefalitidy omezena na laboratorní prostředí. Příhodné by bylo zaměřit se na možnost diagnostiky, například pomocí imunochromatografických metod, které by mohly vést k výrobě běžně využívaných komerčních kitů, jak je tomu u jiných flavivirů.

Například Panbio Dengue Rapid Test umožňuje detekci infekce virem dengue za pouhých sedm minut s poměrně dobrou přesností. Princip testu je jednoduchý (viz obrázek 16). Zlatem označené anti-Dengue mAb reagují po přidání pufru s antigenem. Mezitím dvě kapky séra putují po nitrocelulóзовé membráně, kde jsou zachyceny v jednom pruhu IgG protilátky anti-IgG protilátkami a v druhém pruhu IgM anti-IgM protilátkami. Ve chvíli, kdy dojde k interakci obou stran testu (test se zavře), dojde ke kontaktu mezi navázanými protilátkami a komplexem zlato-mAb-antigen (ZMA). Pokud jsou v séru přítomny anti-Dengue IgG protilátky vytvoří se komplex ZMA – antiDengue IgG – anti-IgG a objeví se zřetelný pruh. Pokud jsou přítomny anti-Dengue IgM protilátky, vytvoří se na stejném principu pruh v místě uchycených anti-IgM protilátek (Sang et al., 1998).



Obrázek 16 Pohled na PanBio Dengue Rapid Test zevnitř, zobrazeny jsou základní instrukce k užití: umístění antigenu, zlatého konjugátu a absorpční oblast. Vyznačeny jsou také anti-human IgG, anti-human IgM a kontrolní proužky. Vyznačena je též hraniční linie. Převzato ze (Sang et al., 1998).

K detekci klíšťové encefalitidy ovšem na trhu žádný test podobného charakteru není, a proto je zde stále volný prostor k působení.

Závěr

Závěrem bych ráda opět zdůraznila důležitost diagnostiky klíšťové encefalitidy. Jedná se o chorobu, která může mít nepříjemné trvalé následky a její incidence stoupá spolu s rozšiřujícími se oblastmi výskytu, nemluvě o importovaných případech v zahraničí (Chaudhuri and Růžek, 2013).

Diagnostika není důležitá pouze v oblasti klinické. Detekce TBEV v mléku hospodářských zvířat by umožnila alespoň částečně předcházet infekcím alimentární cestou. Epizootický výzkum umožňuje detekovat infikované hlodavce a tak úspěšně mapovat přírodní ohniska TBEV (Ikawa-Yoshida et al., 2011).

Posun v diagnostice za posledních deset let je značný. Dříve byla diagnostika klíšťové encefalitidy pracná, časově i finančně náročná. Při využití inaktivovaných virionů TBEV jako antigenu pro metodu ELISA se často objevovaly problémy se zkříženou reaktivitou protilátek u jedinců s protilátkami proti jiným flavivirům (Niedrig et al., 2007; Takashima et al., 1997). Potvrzení nejasných výsledků bylo závislé na provedení neutralizačního testu. Obojí, výroba antigenu pro ELISA a provedení neutralizačního testu bylo omezeno pouze na laboratoře s BSL 3.

Možnost využití subvirových partikulí jako ELISA antigen tyto problémy téměř vyřešila.

- Achazi, K., Nitsche, A., Patel, P., Radonić, A., Mantke, O.D., Niedrig, M., 2011. Detection and differentiation of tick-borne encephalitis virus subtypes by a reverse transcription quantitative real-time PCR and pyrosequencing. *J. Virol. Methods* 171, 34–39. doi:10.1016/j.jviromet.2010.09.026
- Allison, S.L., Ecker, M., Meixner, T., Heinz, F.X., 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* 80, 179–185. doi:10.1099/0022-1317-80-1-179
- Allison, S.L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C.W., Heinz, F.X., 2001. Mutational Evidence for an Internal Fusion Peptide in Flavivirus Envelope Protein E. *J. Virol.* 75, 4268–4275. doi:10.1128/JVI.75.9.4268-4275.2001
- Allison, S.L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C.W., Kunz, C., Heinz, F.X., 1995. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J. Virol.* 69, 695–700.
- Allwinn, R., Doerr, H., Emmerich, P., Schmitz, H., Preiser, W., 2002. Cross-reactivity in flavivirus serology: new implications of an old finding? *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 190, 199–202. doi:10.1007/s00430-001-0107-9
- Avsic-Zupanc, T., Poljak, M., Maticic, M., Radsel-Medvescek, A., LeDuc, J.W., Stiasny, K., Kunz, C., Heinz, F.X., 1995. Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains. *Clin. Diagn. Virol.* 4, 51–59.
- Balogh, Z., Ferenczi, E., Szeles, K., Stefanoff, P., Gut, W., Szomor, K.N., Takacs, M., Berencsi, G., 2010. Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk. *J. Virol. Methods* 163, 481–485. doi:10.1016/j.jviromet.2009.10.003
- Belikov, S.I., Kondratov, I.G., Potapova, U.V., Leonova, G.N., 2014. The Relationship between the Structure of the Tick-Borne Encephalitis Virus Strains and Their Pathogenic Properties. *PLoS ONE* 9, e94946. doi:10.1371/journal.pone.0094946
- Bender, A., Jager, G., Scheuerer, W., Feddersen, B., Kaiser, R., Pfister, H.-W., 2004. Two severe cases of tick-borne encephalitis despite complete active vaccination? the significance of neutralizing antibodies. *J. Neurol.* 251, 353–354. doi:10.1007/s00415-004-0329-z
- Biernat, B., Cieniuch, S., Stańczak, J., 2014. Detection of TBEV RNA in *Ixodes ricinus* ticks in north-eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 21, 689–692. doi:10.5604/12321966.1129915
- Bogovic, P., 2015. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J. Clin. Cases* 3, 430. doi:10.12998/wjcc.v3.i5.430*
- Bogovic, P., Lotric-Furlan, S., Strle, F., 2010. What tick-borne encephalitis may look like: Clinical signs and symptoms. *Travel Med. Infect. Dis.* 8, 246–250. doi:10.1016/j.tmaid.2010.05.011*
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E.A., Grard, G., Grimes, J.M., Hilgenfeld, R., Jansson, A.M., Malet, H., Mancini, E.J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., Moureau, G., Neyts, J., Owens, R.J., Ren, J., Selisko, B., Speroni, S., Steuber, H., Stuart, D.I., Unge, T., Bolognesi, M., 2010. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res.* 87, 125–148. doi:10.1016/j.antiviral.2009.11.009*
- Cecchetto, J., Fernandes, F.C.B., Lopes, R., Bueno, P.R., 2017. The capacitive sensing of NS1 Flavivirus biomarker. *Biosens. Bioelectron.* 87, 949–956. doi:10.1016/j.bios.2016.08.097
- Chao, D.-Y., Galula, J.U., Shen, W.-F., Davis, B.S., Chang, G.-J.J., 2015. Nonstructural Protein 1-Specific Immunoglobulin M and G Antibody Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays in Diagnosis of Flaviviral Infections in Humans. *J. Clin. Microbiol.* 53, 557–566. doi:10.1128/JCM.02735-14
- Chaudhuri, A., Růžek, D., 2013. First documented case of imported tick-borne encephalitis in Australia: Brief Communication. *Intern. Med. J.* 43, 93–96. doi:10.1111/imj.12017
- Chidumayo, N.N., Yoshii, K., Saasa, N., Sakai, M., Kariwa, H., 2014. Development of a tick-borne encephalitis serodiagnostic ELISA using recombinant Fc-antigen fusion proteins. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 78, 373–378. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.12.014
- Chmelík, V., Chrdle, A., Růžek, D., 2016. Fatal tick-borne encephalitis in an immunosuppressed 12-year-old patient. *J. Clin. Virol.* 74, 73–74. doi:10.1016/j.jcv.2015.11.029

- Clement, J., Lagrou, K., Saegeman, V., Maes, P., van Ranst, M., 2016. Letter to the editor: The first tick-borne encephalitis case in the Netherlands: reflections and a note of caution. *Eurosurveillance* 21. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.39.30355
- Danielová, V., Daniel, M., Schwarzová, L., Materna, J., Rudenko, N., Golovchenko, M., Holubová, J., Grubhoffer, L., Kilián, P., 2010. Integration of a Tick-Borne Encephalitis Virus and *Borrelia burgdorferi* sensu lato into Mountain Ecosystems, Following a Shift in the Altitudinal Limit of Distribution of Their Vector, *Ixodes ricinus* (Krkonoše Mountains, Czech Republic). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 10, 223–230. doi:10.1089/vbz.2009.0020
- de Graaf, J.A., Reimerink, J.H.J., Voorn, G.P., bij de Vaate, E.A., de Vries, A., Rockx, B., Schuitemaker, A., Hira, V., 2016. First human case of tick-borne encephalitis virus infection acquired in the Netherlands, July 2016. *Eurosurveillance* 21. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.33.30318
- Directive 2000/54/EC of the European parliament and of the council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC), 2000.
- Donoso Mantke, O., Aberle, S.W., Avšič-Županc, T., Labuda, M., Niedrig, M., 2007. Quality control assessment for the PCR diagnosis of tick-borne encephalitis virus infections. *J. Clin. Virol.* 38, 73–77. doi:10.1016/j.jcv.2006.09.001
- Dumpsis, U., Crook, D., Oksi, J., 1999. Tick-Borne Encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* 28, 882–890. doi:10.1086/515195
- Elshuber, S., 2003. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 84, 183–191. doi:10.1099/vir.0.18723-0
- Ergunay, K., Tkachev, S., Kozlova, I., Růžek, D., 2016. A Review of Methods for Detecting Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Tick, Animal, and Human Specimens. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 16, 4–12. doi:10.1089/vbz.2015.1896*
- European Centre for Disease Prevention and Control (Ed.), 2012. Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries, ECDC technical report. ECDC [u.a.], Stockholm.*
- Eyer, L., Šmídková, M., Nencka, R., Neča, J., Kastl, T., Palus, M., De Clercq, E., Růžek, D., 2016. Structure-activity relationships of nucleoside analogues for inhibition of tick-borne encephalitis virus. *Antiviral Res.* 133, 119–129. doi:10.1016/j.antiviral.2016.07.018
- Gašpárek, M., Šebestová, H., Kříž, B., 2015. Situace ve výskytu klíšťové encefalitidy v České republice do roku 2014. SZÚ*
- Gassmann, C., Bauer, G., 1997. Avidity determination of IgG directed against tick-borne encephalitis virus improves detection of current infections. *J. Med. Virol.* 51, 242–251.
- Grard, G., Moureau, G., Charrel, R.N., Lemasson, J.-J., Gonzalez, J.-P., Gallian, P., Gritsun, T.S., Holmes, E.C., Gould, E.A., de Lamballerie, X., 2007. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology* 361, 80–92. doi:10.1016/j.virol.2006.09.015
- Green, M.R., Sambrook, J., Sambrook, J., 2012. Molecular cloning: a laboratory manual, 4th ed. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.*
- Gresíková, M., Sekeyová, M., Stúpalová, S., Necas, S., 1975. Sheep milk-borne epidemic of tick-borne encephalitis in Slovakia. *Intervirology* 5, 57–61.
- Gritsun, T.S., Frolova, T.V., Zhankov, A.I., Armesto, M., Turner, S.L., Frolova, M.P., Pogodina, V.V., Lashkevich, V.A., Gould, E.A., 2003. Characterization of a Siberian Virus Isolated from a Patient with Progressive Chronic Tick-Borne Encephalitis. *J. Virol.* 77, 25–36. doi:10.1128/JVI.77.1.25-36.2003
- Guirakhoo, F., Heinz, F.X., Mandl, C.W., Holzmann, H., Kunz, C., 1991. Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *J. Gen. Virol.* 72, 1323–1329. doi:10.1099/0022-1317-72-6-1323
- Günther, G., Haglund, M., Lindquist, L., Sköldenberg, B., Forsgren, M., 1997. Intrathecal IgM, IgA and IgG antibody response in tick-borne encephalitis. Long-term follow-up related to clinical course and outcome. *Clin. Diagn. Virol.* 8, 17–29.
- Havlík, J., n.d. Proč je výskyt klíšťové meningoencefalitidy v České republice stále vysoký? *Med. pro praxi* 2010.*
- Heinz, F.X., Roggendorf, M., Hofmann, H., Kunz, C., Deinhardt, F., 1981. Comparison of two different enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin M antibodies against tick-borne encephalitis virus in serum and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 14, 141–146.

- Holzmann, H., 2003. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* 21 Suppl 1, S36-40.*
- Holzmann, H., Aberle, S.W., Stiasny, K., Werner, P., Mischak, A., Zainer, B., Netzer, M., Koppi, S., Bechter, E., Heinz, F.X., 2009. Tick-borne Encephalitis from Eating Goat Cheese in a Mountain Region of Austria. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1671–1673. doi:10.3201/eid1510.090743
- Holzmann, H., Kundi, M., Stiasny, K., Clement, J., McKenna, P., Kunz, C., Heinz, F.X., 1996. Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis. *J. Med. Virol.* 48, 102–107. doi:10.1002/(SICI)1096-9071(199601)48:1<102::AID-JMV16>3.0.CO;2-I
- Ikawa-Yoshida, A., Yoshii, K., Kuwahara, K., Obara, M., Kariwa, H., Takashima, I., 2011. Development of an ELISA system for tick-borne encephalitis virus infection in rodents: ELISA for TBE infection in rodents. *Microbiol. Immunol.* 55, 100–107. doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00296.x
- Inagaki, E., Sakai, M., Hirano, M., Muto, M., Kobayashi, S., Kariwa, H., Yoshii, K., 2016. Development of a serodiagnostic multi-species ELISA against tick-borne encephalitis virus using subviral particles. *Ticks Tick-Borne Dis.* 7, 723–729. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.03.002
- Jaaskelainen, A., Han, X., Niedrig, M., Vaheri, A., Vapalahti, O., 2003. Diagnosis of Tick-Borne Encephalitis by a μ -Capture Immunoglobulin M-Enzyme Immunoassay Based on Secreted Recombinant Antigen Produced in Insect Cells. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4336–4342. doi:10.1128/JCM.41.9.4336-4342.2003
- Jääskeläinen, A.E., Tonteri, E., Sironen, T., Pakarinen, L., Vaheri, A., Vapalahti, O., 2011. European Subtype Tick-borne Encephalitis Virus in *Ixodes persulcatus* Ticks. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 323–325. doi:10.3201/eid1702.101487
- Jacobs, S.C., Stephenson, J.R., Wilkinson, G.W.G., 1993. Sequence of the NS 1 gene of the K 23 isolate of tick-borne encephalitis virus and identification of conserved motifs. *Arch. Virol.* 129, 279–285. doi:10.1007/BF01316902
- Jeffries, C.L., Mansfield, K.L., Phipps, L.P., Wakeley, P.R., Mearns, R., Schock, A., Bell, S., Breed, A.C., Fooks, A.R., Johnson, N., 2014. Louping ill virus: an endemic tick-borne disease of Great Britain. *J. Gen. Virol.* 95, 1005–1014. doi:10.1099/vir.0.062356-0*
- Kaiser, R., 1999. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: A prospective study of 656 patients. *Brain* 122, 2067–2078. doi:10.1093/brain/122.11.2067
- Katargina, O., Russakova, S., Geller, J., Kondrusik, M., Zajkowska, J., Zygutene, M., Bormane, A., Trofimova, J., Golovljova, I., 2013. Detection and Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus in Baltic Countries and Eastern Poland. *PLoS ONE* 8, e61374. doi:10.1371/journal.pone.0061374
- Kiermayr, S., Kofler, R.M., Mandl, C.W., Messner, P., Heinz, F.X., 2004. Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles. *J. Virol.* 78, 8078–8084. doi:10.1128/JVI.78.15.8078-8084.2004
- Kopecký, J., Kuthejlová, M., 1998. Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro. *Parasite Immunol.* 20, 169–174.
- Kovalev, S.Y., Chernykh, D.N., Kokorev, V.S., Snitkovskaya, T.E., Romanenko, V.V., 2009. Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries. *J. Gen. Virol.* 90, 2884–2892. doi:10.1099/vir.0.012419-0
- Kovalev, S.Y., Kokorev, V.S., Belyaeva, I.V., 2010. Distribution of Far-Eastern tick-borne encephalitis virus subtype strains in the former Soviet Union. *J. Gen. Virol.* 91, 2941–2946. doi:10.1099/vir.0.023879-0
- Kuivanen, S., Hepojoki, J., Vene, S., Vaheri, A., Vapalahti, O., 2014. Identification of linear human B-cell epitopes of tick-borne encephalitis virus. *Virol. J.* 11, 115. doi:10.1186/1743-422X-11-115
- Lee, J.M., Crooks, A.J., Stephenson, J.R., 1989. The synthesis and maturation of a non-structural extracellular antigen from tick-borne encephalitis virus and its relationship to the intracellular NS1 protein. *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 2), 335–343. doi:10.1099/0022-1317-70-2-335
- Lehrer, A.T., Holbrook, M.R., 2011. Tick-borne Encephalitis Vaccines. *J. Bioterrorism Biodefense* 1. doi:10.4172/2157-2526.S1-003*
- Leonova, G.N., Ternovoi, V.A., Pavlenko, E.V., Maistrovskaya, O.S., Protopopova, E.V., Loktev, V.B., 2007. Evaluation of vaccine Encepur® Adult for induction of human neutralizing antibodies against recent Far Eastern subtype strains of tick-borne encephalitis virus. *Vaccine* 25, 895–901. doi:10.1016/j.vaccine.2006.09.014

- Levanov, L., Jääskeläinen, A., Vapalahti, O., 2015. Test based on subtype-specific μ -capture IgM immunoassay can distinguish between infections of European and Siberian subtypes of tick-borne encephalitis virus. *J. Clin. Virol.* 73, 81–83. doi:10.1016/j.jcv.2015.11.004
- Levanov, L., Kuivanen, S., Matveev, A., Swaminathan, S., Jaaskelainen-Hakala, A., Vapalahti, O., 2014. Diagnostic Potential and Antigenic Properties of Recombinant Tick-Borne Encephalitis Virus Subviral Particles Expressed in Mammalian Cells from Semliki Forest Virus Replicons. *J. Clin. Microbiol.* 52, 814–822. doi:10.1128/JCM.02488-13
- Lindquist, L., Vapalahti, O., 2008. Tick-borne encephalitis. *The Lancet* 371, 1861–1871. doi:10.1016/S0140-6736(08)60800-4*
- Litzba, N., Zelená, H., Kreil, T.R., Niklasson, B., Kühlmann-Rabens, I., Remoli, M.E., Niedrig, M., 2014. Evaluation of Different Serological Diagnostic Methods for Tick-Borne Encephalitis Virus: Enzyme-Linked Immunosorbent, Immunofluorescence, and Neutralization Assay. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 14, 149–159. doi:10.1089/vbz.2012.1287
- Lorenz, I.C., Allison, S.L., Heinz, F.X., Helenius, A., 2002. Folding and Dimerization of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins prM and E in the Endoplasmic Reticulum. *J. Virol.* 76, 5480–5491. doi:10.1128/JVI.76.11.5480-5491.2002
- Lotric-Furlan, S., Avsic-Zupanc, T., Strle, F., 2002. An abortive form of tick-borne encephalitis (TBE)--a rare clinical manifestation of infection with TBE virus. *Wien. Klin. Wochenschr.* 114, 627–629.
- Ludolfs, D., Reinholz, M., Schmitz, H., 2009. Highly specific detection of antibodies to tick-borne encephalitis (TBE) virus in humans using a domain III antigen and a sensitive immune complex (IC) ELISA. *J. Clin. Virol.* 45, 125–128. doi:10.1016/j.jcv.2009.03.016
- Lukman, N., Salim, G., Kosasih, H., Susanto, N.H., Parwati, I., Fitri, S., Alisjahbana, B., Widjaja, S., Williams, M., 2016. Comparison of the Hemagglutination Inhibition Test and IgG ELISA in Categorizing Primary and Secondary Dengue Infections Based on the Plaque Reduction Neutralization Test. *BioMed Res. Int.* 2016, 1–5. doi:10.1155/2016/5253842
- Lundkvist, K., Vene, S., Golovljova, I., Mavtchoutko, V., Forsgren, M., Kalnina, V., Plyusnin, A., 2001. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: evidence for co-circulation of three distinct subtypes. *J. Med. Virol.* 65, 730–735.
- Mandl, C.W., 2005. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res.* 111, 161–174. doi:10.1016/j.virusres.2005.04.007*
- Mansfield, K.L., Horton, D.L., Johnson, N., Li, L., Barrett, A.D.T., Smith, D.J., Galbraith, S.E., Solomon, T., Fooks, A.R., 2011. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J. Gen. Virol.* 92, 2821–2829. doi:10.1099/vir.0.031641-0
- Marx, F., Gritsun, T.S., Grubeck-Loebenstien, B., Gould, E.A., 2001. Diagnostic immunoassays for tick-borne encephalitis virus based on recombinant baculovirus protein expression. *J. Virol. Methods* 91, 75–84.
- Muhd Radzi, S.F., Rückert, C., Sam, S.-S., Teoh, B.-T., Jee, P.-F., Phoon, W.-H., Abubakar, S., Zandi, K., 2015. Detection of Langkat virus by TaqMan real-time one-step qRT-PCR method. *Sci. Rep.* 5. doi:10.1038/srep14007
- Mukhin, K.Y., Mameniškienė, R., Mironov, M.B., Kvaskova, N.E., Bobylova, M.Y., Petrukhin, A.S., Wolf, P., 2012. Epilepsia partialis continua in tick-borne Russian spring-summer encephalitis: EPC in tick-borne summer encephalitis. *Acta Neurol. Scand.* 125, 345–352. doi:10.1111/j.1600-0404.2011.01575.x
- Muto, M., Bazartseren, B., Tsevel, B., Dashzevge, E., Yoshii, K., Kariwa, H., 2015. Isolation and characterization of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes persulcatus* in Mongolia in 2012. *Ticks Tick-Borne Dis.* 6, 623–629. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.05.006
- Niedrig, M., Avšič, T., Aberle, S.W., Ferenczi, E., Labuda, M., Rozentale, B., Donoso Mantke, O., 2007. Quality control assessment for the serological diagnosis of tick borne encephalitis virus infections. *J. Clin. Virol.* 38, 260–264. doi:10.1016/j.jcv.2006.12.013
- Nosek, J., Grulich, I., 1967. The relationship between the tick-borne encephalitis virus and the ticks and mammals of the Tribec mountain range. *Bull. World Health Organ.* 36 Suppl, 31–47.
- Obara, M., Yoshii, K., Kawata, T., Hayasaka, D., Goto, A., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I., 2006. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of tick-borne encephalitis using subviral particles. *J. Virol. Methods* 134, 55–60. doi:10.1016/j.jviromet.2005.11.018
- Orlinger, K.K., Hofmeister, Y., Fritz, R., Holzer, G.W., Falkner, F.G., Unger, B., Loew-Baselli, A., Poellabauer, E.-M., Ehrlich, H.J., Barrett, P.N., Kreil, T.R., 2011. A Tick-borne Encephalitis

- Virus Vaccine Based on the European Prototype Strain Induces Broadly Reactive Cross-neutralizing Antibodies in Humans. *J. Infect. Dis.* 203, 1556–1564. doi:10.1093/infdis/jir122
- Peleg, J., 1969. Behaviour of infectious RNA from four different viruses in continuously subcultured *Aedes aegypti* mosquito embryo cells. *Nature* 221, 193–194.
- Pletnev, A.G., Yamshchikov, V.F., Blinov, V.M., 1986. Tick-borne encephalitis virus genome: The nucleotide sequence coding for virion structural proteins. *FEBS Lett.* 200, 317–321. doi:10.1016/0014-5793(86)81160-7
- Potapova, U.V., Feranchuk, S.I., Potapov, V.V., Kulakova, N.V., Kondratov, I.G., Leonova, G.N., Belikov, S.I., 2012. NS2B/NS3 protease: allosteric effect of mutations associated with the pathogenicity of tick-borne encephalitis virus. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 30, 638–651. doi:10.1080/07391102.2012.689697
- Puchhammer-Stöckl, E., Kunz, C., Mandl, C.W., Heinz, F.X., 1995. Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clin. Diagn. Virol.* 4, 321–326.
- Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C., Harrison, S.C., 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291–298. doi:10.1038/375291a0
- Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L., Strauss, J.H., 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229, 726–733.
- Růžek, D., Donoso, M., Karan, L.S., 2011. Tick-Borne Encephalitis Virus: A general overview, in: Růžek, D. (Ed.), *Flavivirus Encephalitis*. INTECH Open Access Publisher, pp. 133–156.*
- Růžek, D., Yakimenko, V.V., Karan, L.S., Tkachev, S.E., 2010. Omsk haemorrhagic fever. *The Lancet* 376, 2104–2113. doi:10.1016/S0140-6736(10)61120-8*
- Saksida, A., Duh, D., Lotrič-Furlan, S., Strle, F., Petrovec, M., Avšič-Županc, T., 2005. The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. *J. Clin. Virol.* 33, 331–335. doi:10.1016/j.jcv.2004.07.014
- Sang, C.T., Hoon, L.S., Cuzzubbo, A., Devine, P., 1998. Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of dengue virus infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 407–409.
- Schalich, J., Allison, S.L., Stiasny, K., Mandl, C.W., Kunz, C., Heinz, F.X., 1996. Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *J. Virol.* 70, 4549–4557.
- Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W., Walsh, E.E., 1987. Protection of Mice Against Dengue 2 Virus Encephalitis by Immunization with the Dengue 2 Virus Non-structural Glycoprotein NS1. *J. Gen. Virol.* 68, 853–857. doi:10.1099/0022-1317-68-3-853
- Schwaiger, M., Cassinotti, P., 2003. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J. Clin. Virol.* 27, 136–145. doi:10.1016/S1386-6532(02)00168-3
- Sethi, J., Pei, D., Hirshaut, Y., 1981. Choice and specificity of complement in complement fixation assay. *J. Clin. Microbiol.* 13, 888–890.
- Stadler, K., Allison, S.L., Schalich, J., Heinz, F.X., 1997. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* 71, 8475–8481.
- Stiasny, K., Aberle, J.H., Chmelik, V., Karrer, U., Holzmann, H., Heinz, F.X., 2012. Quantitative determination of IgM antibodies reduces the pitfalls in the serodiagnosis of tick-borne encephalitis. *J. Clin. Virol.* 54, 115–120. doi:10.1016/j.jcv.2012.02.016
- Stiasny, K., Kiermayr, S., Holzmann, H., Heinz, F.X., 2006. Cryptic Properties of a Cluster of Dominant Flavivirus Cross-Reactive Antigenic Sites. *J. Virol.* 80, 9557–9568. doi:10.1128/JVI.00080-06
- Süs, J., 2011. Tick-borne encephalitis: Disease epidemiology and burden of disease.*
- Takashima, I., Morita, K., Chiba, M., Hayasaka, D., Sato, T., Takezawa, C., Igarashi, A., Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Hashimoto, N., 1997. A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1943–1947.
- Taylor, R.T., Lubick, K.J., Robertson, S.J., Broughton, J.P., Bloom, M.E., Bresnahan, W.A., Best, S.M., 2011. TRIM79 α , an Interferon-Stimulated Gene Product, Restricts Tick-Borne Encephalitis Virus Replication by Degrading the Viral RNA Polymerase. *Cell Host Microbe* 10, 185–196. doi:10.1016/j.chom.2011.08.004
- Throsby, M., Geuijen, C., Goudsmit, J., Bakker, A.Q., Korimbocus, J., Kramer, R.A., Clijsters-van der Horst, M., de Jong, M., Jongeneelen, M., Thijssen, S., Smit, R., Visser, T.J., Bijl, N., Marissen,

- W.E., Loeb, M., Kelvin, D.J., Preiser, W., ter Meulen, J., de Kruif, J., 2006. Isolation and Characterization of Human Monoclonal Antibodies from Individuals Infected with West Nile Virus. *J. Virol.* 80, 6982–6992. doi:10.1128/JVI.00551-06
- Vani, K., Bogen, S.A., Sompuram, S.R., 2006. A high throughput combinatorial library technique for identifying formalin-sensitive epitopes. *J. Immunol. Methods* 317, 80–89. doi:10.1016/j.jim.2006.09.009
- Vene, S., Haglund, M., Vapalahti, O., Lundkvist, A., 1998. A rapid fluorescent focus inhibition test for detection of neutralizing antibodies to tick-borne encephalitis virus. *J. Virol. Methods* 73, 71–75.
- Venturi, G., Mel, R., Marchi, A., Mancuso, S., Russino, F., Pra, G.D., Papa, N., Bertiato, G., Fiorentini, C., Ciufolini, M.G., 2006. Humoral immunity and correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis virus in children. *J. Virol. Methods* 134, 136–139. doi:10.1016/j.jviromet.2005.12.010
- Wallner, G., Mandl, C.W., Kunz, C., Heinz, F.X., 1995. The Flavivirus 3'-Noncoding Region: Extensive Size Heterogeneity Independent of Evolutionary Relationships among Strains of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Virology* 213, 169–178. doi:10.1006/viro.1995.1557
- Weidmann, M., Ruzek, D., Krivanec, K., Zoller, G., Essbauer, S., Pfeffer, M., Zanotto, P.M. d. A., Hufert, F.T., Dobler, G., 2011. Relation of genetic phylogeny and geographical distance of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *J. Gen. Virol.* 92, 1906–1916. doi:10.1099/vir.0.032417-0
- Wu, Y., Cho, M., Shore, D., Song, M., Choi, J., Jiang, T., Deng, Y.-Q., Bourgeois, M., Almli, L., Yang, H., Chen, L.-M., Shi, Y., Qi, J., Li, A., Yi, K., Chang, M., Bae, J., Lee, H., Shin, J., Stevens, J., Hong, S., Qin, C.-F., Gao, G., Chang, S., Donis, R., 2016. Haemagglutination Inhibition (HI) Assay of Influenza Viruses with Monoclonal Antibodies. *BIO-Protoc.* 6. doi:10.21769/BioProtoc.1828
- Yoshii, K., Hayasaka, D., Goto, A., Obara, M., Araki, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I., 2003. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens expressed in mammalian cells for serodiagnosis of tick-borne encephalitis. *J. Virol. Methods* 108, 171–179.
- Ytrehus, B., Vainio, K., Dudman, S.G., Gilray, J., Willoughby, K., 2013. Tick-borne encephalitis virus and louping-ill virus may co-circulate in Southern Norway. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 13, 762–768. doi:10.1089/vbz.2012.1023
- Zeman, P., Pazdiora, P., Chmelik, V., Januska, J., Sedivy, K., Guglielmone, A.A., Iriarte, J.A., Medkova, Z., 2007. Epidemiological survey of tick-borne encephalitis virus and *Anaplasma phagocytophilum* co-infections in patients from regions of the Czech Republic endemic for tick-borne diseases. *Wien. Klin. Wochenschr.* 119, 538–543. doi:10.1007/s00508-007-0852-x

* *sekundární citace*

Internetové zdroje

- CDC Kyasanur [WWW Document], 2014. URL <https://www.cdc.gov/vhf/kyasanur/index.html>
- CDC OHF [WWW Document], 2013. URL <https://www.cdc.gov/vhf/omsk/index.html>
- CDC Powassan [WWW Document], 2017. URL <https://www.cdc.gov/powassan/>
- Protean, s.r.o, 2008-2017, online. Analýza klíšťete [WWW Document]. URL <https://www.kliste.cz/cz/vysetreni-klistat/vyber-vysetreni>
- Sino Biological Inc. Indirect ELISA [WWW Document], 2004, online. URL <http://www.elisa-antibody.com/index.php?page=indirect-elisa>
- Vidia, 2014a online. Anti-TBEV ELISA VIDITEST. http://www.vidia.cz/images/stories/Nove_letaky/TBEV_CZ.pdf
- Vidia, 2014b online. URL <http://vidia.cz/en/index.php/antigens-for-complement-fixation-assay>
- Zelená, H., Raszka, J., Januška, J., online. Laboratorní diagnostika klíšťové encefalitidy a jiných flavivirových neuroinfekcí. http://www.vidia.cz/images/stories/ke_stazeni/lab_%20diagn_%20kl_encef_%20a_dalsich_flavivirov_inf.pdf